



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DICLOFENACO SÓDICO EN
PLASMA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

GUILLERMO DE ANDA JÁUREGUI



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Helgi Helene Jung Cook
VOCAL: Profesor: Sofía Margarita Rodríguez Alvarado
SECRETARIO: Profesor: Juan Manuel Rodríguez
1er. SUPLENTE: Profesor: Liz Jannet Medina Reyes
2° SUPLENTE: Profesor: María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 112 y 113, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor del tema

Helgi Helen Jung Cook

Supervisor Técnico

M en C. María de Lourdes Mayet Cruz

Sustentante

Guillermo de Anda Jáuregui

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS:

Ésta va para todos.

Para mi familia, Mambi, Ppto y Kiskis, que se encargaron de todo por los últimos 23 años y ahí siguen.

Para mi Abuela Abogada, que puso la casa y me hizo gordo, mi abuelo Enrique, del que me robé la carrera, mis otros abuelos, Marielena y Enrique, mi tía Nena, mi tío Miguel Angel, del que me robé el humor, y mi tío Fico, que usaba tirantes. Para todos los que nos apoyan desde el otro lado.

A mis demás parientes por todas las ayudas que me brindaron.

A la Doctora Helgi Jung por su apoyo y tutela durante la realización del presente trabajo, y cuya ética de trabajo constante y honesto fueron un ejemplo.

A todo el equipo de los laboratorios de Biofarmacia, la Maestra Lourdes Mayet, la Maestra Margarita Rodríguez, la Dra. Inés Fuentes, la Maestra Kenneth Rubio y el profesor Roberto Carlos, que me dieron todas las facilidades para trabajar con extrema libertad y comodidad, y en algún momento me ayudaron en algo.

A mis profesores de la carrera, particularmente al Ing. Alejandro Iñiguez y la Dra. Perla Castañeda, y sus respectivos equipos de trabajo, que me brindaron orientación y guía a lo largo de mis años como universitario, y que me enseñaron mucho.

A los maestros que me enseñaron antes de la carrera, en especial a Enrique Caldas, Donata Schifflini, Atenea García, Julián Atilano, Carmen Romay y Juan Ortega.

A todos los doctores que evitaron que me muriera de alguna de las múltiples dolencias que he sufrido, y que me permitieron llegar hasta ahora, especialmente Balmaceda, Laura Mayorga y Avilés.

A toda la raza que estuvo conmigo en todas las correrías de la carrera, de todas las razas: Jardinera (Extendida y Reducto), Auditorio, legión Ñoña, Malos, Buenos, Mejores, Coapos, Mateys y camaradas que no entran en otra clasificación pero que se les estima de igual manera. La categoría es larga y considerense aludidos si entran en cualquiera de las anteriores.

A la señorita Alicia, Facio, Gabes, Daniel Alfonso, Esteban, Rafa, Fabiola, Stephanie, Myrna, Gaby, Ana, Mau, Carmela, Majo, Lau Merol, Midori, Cedric, Lucero, Lucía, Jorge, Adriana, Romina, Susana, Paulina, Ivan, Sonic, Lucoca, Paola Margarita, Marco Cabeza de Buzón, Rosaurora, por ser mi nación en algún momento u otro, pasado o futuro, y amor especial a Eleonor y Lau, porque sin ellas hubiera pasado toda la carrera en una esquina.

A los miembros de las Colinas de la Biofarmacia, egresados, presentes y por venir, mencionando a los miembros de mis tiempos: Maggie, Joel, Saul, Josecito, el Padrino, Luis, Giselle, Ana Lidia, Gaby, Jaque, Jessica, Hernán, Geovanny, Roy, los yucatecos honorarios, mis hijos Carlos y Danielito, y nuestras líderes Sofía y Erandi, de quienes aprendí la parte oscura de la cromatografía.

A todos mis amigos pasados y futuros, y en especial a las personas que evitaron mi destrucción en el pasado, y sin las cuales probablemente estaría en una cómoda celda acolchonada, escuchando a Wagner todo el día: Itzel, el Gordo Luis Alberto Velasco Ruiz, Sergio, Frida, Joseph, Rui, Saul y Jimena.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A los Dioses, que al final permitieron que éste día llegara, sin cataclismos.

A los amigos y enemigos del yo moderno.

A todos.

Gracias

X

TABLA DE CONTENIDOS

Capítulo 1: Introducción.....	1
Capítulo 2: Generalidades	3
Diclofenaco.....	4
Cuantificación de fármacos en fluidos biológicos.....	9
Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	12
Validación de Métodos Analíticos.....	20
Capítulo 3: Parte Experimental	23
3.1 Equipo:	24
3.2 Reactivos	24
3.3 Método analítico para la cuantificación de diclofenaco sódico en plasma	25
3.3.1 Revisión de la literatura	25
3.3.2 Diseño de curva de calibración y puntos control	28
3.3.3 Desarrollo del método analítico.....	31
3.3.4 Evaluación de Métodos de Extracción	33
3.4 Validación del método analítico.....	35
3.4.1 Selectividad	35
3.4.2 Linealidad	35
3.4.3 Precisión	35
3.4.4 Exactitud.....	36
3.4.5 Recuperación Absoluta	36
3.4.6 Límites de cuantificación.....	37
3.4.7 Influencia de la dilución	37
3.4.8 Estabilidad	37
Capítulo 4: Resultados y discusión.....	39
4.1 Selección de condiciones cromatográficas	40
4.2 Selección de disolvente y condiciones de extracción	42
4.3 Identificación de Estándar Interno.....	43
4.4 Método analítico para cuantificación de diclofenaco en plasma	44
4.5 Prueba de linealidad del método.....	45

4.6 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DICLOFENACO EN PLASMA	47
4.6.1 SELECTIVIDAD.....	47
4.6.2 LINEALIDAD	50
4.6.3 PRECISIÓN	52
4.6.4 EXACTITUD	54
4.6.5 RECUPERACIÓN ABSOLUTA.....	55
4.6.6 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	56
4.6.7 INFLUENCIA DE LA DILUCIÓN	57
4.6.8 ESTABILIDAD.....	58
Capítulo 5: Conclusiones	64
Bibliografía	66

Índices:

Diagramas:

Diagrama 1: Preparación de Curva Patrón de diclofenaco	29
Diagrama 2: Algoritmo para seleccionar las condiciones cromatográficas	32
Diagrama 3: Prueba de métodos de extracción	34

Figuras:

Figura 1: Estructura tridimensional del diclofenaco	4
Figura 2: Linealidad de las curvas de calibración, con valores convertidos a escala logarítmica	45
Figura 3: Diclofenaco sódico en solución	47
Figura 4 : Blanco de reactivos	48
Figura 5: Plasma con diclofenaco sódico	48
Figura 6: Pool de voluntarios, blanco	48
Figura 8: Naproxeno en solución	49
Figura 9: Linealidad del método analítico para la cuantificación de diclofenaco en el rango de concentración de 0.15 a 3.0 µg/ml	50

Tablas

Tabla 1: Detectores empleados en cromatografía líquida de alta resolución	16
Tabla 2: Métodos reportados en la bibliografía	26
Tabla 3: Métodos cromatográficos a probar	31
Tabla 4: Métodos de extracción probados:	33
Tabla 5: Influencia de la fase móvil y tipo de columna en la respuesta cromatográfica de diclofenaco:	40
Tabla 6: Linealidad del sistema para la cuantificación de diclofenaco sódico en fase móvil (Acetonitrilo:Agua:Ácido acético glacial 60:40:2 v:v:v)	41
Tabla 7: Evaluación de condiciones de extracción de diclofenaco en plasma	42
Tabla 8: Compuestos probados	43
Tabla 9: Pruebas de ibuprofeno como estándar interno	43
Tabla 10: Características del método analítico para cuantificación de diclofenaco sódico en plasma	44
Tabla 11: Resultados de tres curvas de calibración	45
Tabla 12: Ecuaciones de Altura vs Concentración	45
Tabla 13: Relación entre logaritmo de concentración y logaritmo de altura para la cuantificación de diclofenaco en plasma	51
Tabla 14: Promedios de concentración recuperada para cada rango de concentración, la desviación estándar y el coeficiente de variación.	52
Tabla 15: Precisión del método analítico para cuantificar diclofenaco en plasma en diferentes días.	53
Tabla 17: Desviaciones estándar absolutas de cada muestra inyectada para los cálculos de precisión.	54
Tabla 18: Resultados de recobro absoluto	55
Tabla 19: Concentraciones recuperadas para muestras de 0.15 µg / ml y medidas de dispersión.	56
Tabla 20: Concentraciones recuperadas para muestras de 0.075 µg / ml y medidas de dispersión.	56
Tabla 21: Efecto de la dilución	57
Tabla 22: Resultados de análisis de muestras procesadas en automuestreador	59

<i>Tabla 23: Resultados del análisis de muestras procesadas congeladas.</i>	60
<i>Tabla 24: Resultados del análisis de muestras en mesa de trabajo.</i>	61
<i>Tabla 25: Resultados del análisis de muestras sometidas a ciclos de congelación y descongelación.</i>	62
<i>Tabla 26: Resultados del análisis de muestras almacenadas a largo plazo en congelación</i>	63

Capítulo 1: Introducción

Introducción:

Diclofenaco es el nombre genérico del fármaco antiinflamatorio no esterooidal sintetizado por primera vez en 1973 por Ciba-Geigy (ahora Novartis)¹. En 1988 recibió la aprobación de la FDA para comercialización en los Estados Unidos de Norteamérica².

Por sus propiedades antipiréticas, antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas, es ampliamente utilizado para el tratamiento de la artritis (reumatoide, osteoartritis, espondiloartritis, espondolitis anquilosante), ataques de gota, y manejo del dolor causado por cálculos renales y biliares, así como dolores menstruales, entre otros. Su aplicación tópica puede reducir la inflamación muscular, lo que lo hace también un fármaco de elección en el tratamiento de traumatismos y dolores musculares agudos³.

En nuestro país el fármaco se encuentra en las siguientes presentaciones farmacéuticas: solución inyectable, suspensión, crema, gel tópico, supositorios, cápsulas, grageas, grageas de liberación prolongada⁴.

El Acuerdo por el que se adiciona y modifica la relación de especialidades farmacéuticas susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables⁵, publicado en 2005, establece que las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable pueden ser: estudios *in vitro*, pruebas de bioequivalencia o bien estudios farmacodinámicos. Para el caso del diclofenaco, la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios), ha designado la prueba C (estudio de bioequivalencia) para los productos que contienen este fármaco en presentación tabletas, suspensión o liberación prolongada.

Considerando lo anterior, se desarrolló el presente trabajo, cuyos objetivos fueron:

Objetivo general:

Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de diclofenaco sódico en plasma humano, aplicable a un estudio de farmacocinética, biodisponibilidad o bioequivalencia.

Objetivos particulares:

Encontrar las condiciones cromatográficas y de extracción para la adecuada detección y cuantificación de diclofenaco en plasma.

Validar dicho método de acuerdo a los criterios establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, *Que Establece Las Pruebas y procedimientos para demostrar que un Medicamento es Intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas*⁶

Capítulo 2: Generalidades

Diclofenaco

El diclofenaco es un miembro de la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), ampliamente utilizado como agente antiinflamatorio.

Es un derivado del ácido fenilacético, Consiste en dos anillos aromáticos unidos a través de un grupo amino secundario. Uno contiene dos sustituciones de cloro, mientras el otro tiene una sustitución acética. En la figura 1 se presenta su estructura tridimensional, en la cual el grupo fenilo clorado presenta una torsión de 69° con respecto al plano¹:

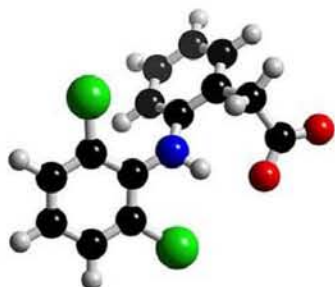


Figura 1: Estructura tridimensional del diclofenaco.

Nombre IUPAC: ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil]acético

Propiedades fisicoquímicas⁷:

Peso Molecular: 296.149 g/mol base, 318.14 g/mol forma sódica

pKa: 4.0

LogP: 3.9

Descripción: Polvo blanco cristalino, inodoro, de sabor ligeramente amargo.

Polimorfismos: No encontrados en la literatura.

Solubilidad en agua: 14.18 mg/ml

Solubilidad en otros disolventes: Se observa una marcada disminución de la solubilidad a pH bajo, tanto en solución de ácido clorhídrico (0.0012 mg/ml en solución 0.1 N, pH= 1.2) como en solución amortiguadora de fosfatos (0.036 mg/ml en solución de pH =5.5)

Clasificación biofarmacéutica: Clase II, baja solubilidad, alta permeabilidad.

Dosis terapéutica: Las preparaciones comerciales orales del fármaco en su mayoría contienen una dosis de 25 mg, aunque existen preparaciones de 12.5 y 50 mg.

Farmacodinamia^{3,8}:

El diclofenaco es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Como otros compuestos de la misma clasificación, su mecanismo de acción no está dilucidado del todo, pero se asume que el diclofenaco interactúa con la cascada de ácido araquidónico el nivel de la ciclooxigenasa del ácido araquidónico (COX).

La COX es la enzima involucrada en la interconversión del ácido araquidónico en prostaglandina H₂. Existen tres isoenzimas: COX-1, COX-2 y COX-3. La isoenzima COX-1 es constitutiva de la mayoría de los tejidos y está involucrada en la homeostasis tisular. La isoenzima COX-3 fue recientemente descubierta y se cree que está involucrada en procesos piréticos. La isoenzima COX-2 es una enzima inducible en células inflamatorias activadas, y la cascada que activa en éstas genera la producción de citocinas proinflamatorias, como son Interleucina-1 y factor de necrosis tumoral.

El diclofenaco es un inhibidor no selectivo de COX, lo que significa que tiene afinidad hacia todas las isoformas. En el proceso de diseño del fármaco¹, se buscó que el grupo fenilo tuviera una torción de 69°, lo que previamente había sido asociado a una mayor afinidad con el sitio de inhibición de ambas isoformas de COX.

Además del efecto tradicional de inhibición de COX como los otros AINES, existe evidencia de una inhibición de la vía de las lipoxigenasas, inhibiendo la formación de leucotrienos y por consiguiente inhibiendo la liberación de factores de inflamación en otra vía⁸.

Vida media: 1.1-2 h⁷.

Farmacocinética^{7,8,9,10,11,12,13}:

El diclofenaco se absorbe rápidamente por vía oral. El 100% del fármaco es absorbido en el tracto gastrointestinal en relación a la administración intravenosa. Los resultados de pruebas *in vivo* e *in vitro* (en membranas de células Caco-2) indican que existe una alta permeabilidad en el tracto gastrointestinal, lo explica su rápida y completa absorción. Sin embargo, gracias al efecto de primer paso, solo 60% llega a la circulación sistémica⁷.

Existe linealidad en la absorción del fármaco en el rango de 25-250 mg, lo que sugiere que a pesar de una baja solubilidad del fármaco a pH bajo, ello no es limitante para la absorción⁷.

Después de la administración de una formulación de liberación inmediata sin recubrimiento entérico de 50mg la concentración máxima plasmática es de de 1.5 µg/ml⁴ aproximadamente, aunque diferentes estudios describen concentraciones máximas que van desde 1.0 µg/ml⁹ hasta 2.5 µg/ml¹⁰. Las concentraciones plasmáticas de formulaciones con recubrimiento entérico son semejantes a las reportadas en formulaciones de liberación inmediata (1.5 µg/ml¹¹). Las formulaciones de liberación modificada de 100 mg alcanzan niveles plasmáticos máximos de 0.5 µg/ml¹¹

El tiempo aproximado para alcanzar la concentración máxima plasmática para las formulaciones de liberación inmediata es de 1h⁴, con valores que van desde 0.53 h¹⁰ hasta 2.2 h⁹. Para las formulaciones con recubrimiento entérico, el tiempo de liberación es de aproximadamente 3 horas^{11, 12}.

La administración con alimentos puede aumentar el tiempo de absorción y por consiguiente retardar el tiempo para alcanzar la concentración máxima plasmática; no obstante, no existe un efecto significativo en la cantidad absorbida del fármaco al administrarse con alimentos.

En un estudio realizado por Kirchheiner¹³ se encontró que el valor de área bajo la curva a tiempo infinito fue de 3.21mg*h/l, al administrar una formulación de liberación inmediata de 50 mg; por su parte, Lotsch reporta una ABC de 0 a 5h de 4.67 mg*h/l empleando una formulación con recubrimiento entérico, mientras que Idkaidek¹² reporta una ABC de 24h a tiempo infinito de 7065 ng*h/ml para tabletas de liberación modificada de igual dosis.

La biodisponibilidad del fármaco por vía oral es de aproximadamente entre 50% y 60%, principalmente por efecto de primer paso asociado al citocromo P450 3A4 intestinal¹³

El volumen aparente de distribución del diclofenaco sódico es de 1.4 L/kg. El 99% del fármaco en plasma se encuentra unido a proteínas, principalmente albúmina; sin embargo, ésta unión es farmacocinéticamente insignificante en tanto que existe una rápida asociación-disociación del fármaco a la albúmina, lo que permite que el fármaco permee a través de las membranas vasculares y llegue a los tejidos.⁷

El diclofenaco presenta una vida media de 1.1-2 h⁷. Menos del 1% del fármaco es excretado por orina en forma inalterada^{3,7,8}. El metabolito principal del diclofenaco es el 4'-hidroxidiclofenaco, aunque también se forman los metabolitos 3'-hidroxidiclofenaco y 5'-hidroxidiclofenaco. La producción de los dos primeros se

cataliza por medio del Citocromo P450 (CYP) 2C9, mientras que el último es mayoritariamente catalizado por CYP3A4¹³.

Tanto el diclofenaco base como sus metabolitos pueden sufrir reacciones de sulfonación y glucoronidación. El 65% del fármaco es eliminado en forma de metabolitos por orina; el 35% restante se elimina por bilis⁷.

Indicaciones terapéuticas:

El uso de diclofenaco está indicado en padecimientos de inflamación musculoesqueléticos, especialmente artritis, artritis reumatoide, polimitosis, dermatomitos, osteoartritis, dolor dental, inflamación de la articulación temporomandibular, espondiloartropatía, espondilitis anquilosante, ataques de gota, y para el tratamiento de dolor agudo por cálculos biliares y renales, dolor postraumático ligero o moderado, y dolor menstrual o endometriosis.

Las preparaciones tópicas de diclofenaco, generalmente en forma de diclofenaco trietilamonio, son empleadas para tratar dolor muscular producido por traumatismo y para el tratamiento de keratosis actínica.

Reacciones adversas y contraindicaciones: El diclofenaco es uno de los AINE mejor tolerados por la población general; 20% de los pacientes que lo consumen de manera crónica experimentan reacciones adversas, y solo el 2% tiene que discontinuar su uso.

La principal reacción adversa presentada es daño gastrointestinal; la aparición de úlceras o sangrado es causa para terminar el tratamiento de manera inmediata; la mayoría de los pacientes crónicos reciben una administración concomitante de medicamentos anti-ulcerosos de manera profiláctica.

Existe la posibilidad baja de daño hepático, aunque es usualmente reversible.

Por su acción sobre la ciclooxigenasa (COX) 2, es posible que el uso prolongado de diclofenaco aumente el riesgo de infarto al miocardio.

La reducción en síntesis de prostaglandinas renales puede ocasionar daño a los riñones, principalmente en personas que presentan una predisposición y en usuarios crónicos en los cuales la tolerancia se reduce con la edad.

Existen reportes aislados de depresión de la médula espinal, inducción de anemia hemolítica por inducir la aparición de anticuerpos contra el grupo Rh, y afectación del ciclo menstrual.

Por lo anterior, el uso de diclofenaco está contraindicado en personas que presenten reacciones alérgicas al fármaco u a otros AINEs, durante el tercer trimestre del

embarazo, sangrado (gastrointestinal o en otros tejidos) activo, enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal, insuficiencia cardíaca, insuficiencia hepática, insuficiencia renal, porfiria hepática, y virus hemorrágicos como dengue.

Cuantificación de fármacos en fluidos biológicos¹⁴:

La cuantificación de fármacos en fluidos biológicos es la herramienta primordial para realizar estudios de farmacocinética y de bioequivalencia.

A diferencia de la cuantificación de fármacos en solución, que puede ser de utilidad para procesos de control de calidad de medicamentos, al tratar de realizar una cuantificación de fármaco en un fluido biológico debemos considerar que existirán otros analitos en la muestra además de nuestro fármaco de interés.

Se llama matriz biológica al fluido biológico en el cual se pretende cuantificar el fármaco. Algunas de las matrices biológicas más comunes son:

Orina: Es el nombre con el que se conoce al líquido de desecho expulsado por la uretra. Consiste en una mezcla de sustancias solubles en agua que el organismo busca expulsar. Sus propiedades físicas dependen en gran medida de la dieta. Químicamente se encuentra, en individuos sanos, libre de proteínas y lípidos. Es usada para estudios farmacocinéticos y de bioequivalencia cuando más del 50% del fármaco se excreta de manera inalterada. Debido a que el volumen de orina no es constante en un tiempo, se cuantifica la cantidad del fármaco excretada, y no la concentración.

Sangre: Fluido especializado en transporte de sustancias desde y hacia los diferentes tejidos del cuerpo. Consiste en un líquido con proteínas solubilizadas, grasas, sales disueltas y células suspendidas. Se compone de dos partes celulares distintas: la serie roja, compuesta por eritrocitos, y la serie blanca, compuesta por células del sistema inmune. Su empleo en cuantificación de fármacos se limita a sustancias con alta afinidad por los componentes celulares de la sangre.

Suero: Derivado de la sangre a partir de la coagulación de ésta y la posterior separación por centrifugación del paquete celular, fibrinógeno y factores de coagulación. Regularmente se emplea para cuantificar fármacos sin afinidad por células ni proteínas.

Plasma: Obtenido de la centrifugación de la sangre a la que se ha adicionado un anticoagulante, puede considerarse el suero con factores de coagulación y fibrinógeno. Es el fluido biológico de elección para fármacos con alta afinidad a las proteínas plasmáticas.

Procesamiento de fluidos biológicos:

El procesamiento de fluidos biológicos es un paso crítico en la cuantificación del fármaco, en tanto que es muy difícil cuantificar una sustancia en una mezcla compleja sin someterla a un tratamiento previo.

De esta manera, se busca tener procesos de muestras biológicas que sean sencillos, requieran poca manipulación, no interfieran con el proceso de cuantificación, no modifiquen al fármaco de manera que sea imprecisa su cuantificación, sean reproducibles, y sean lo más económicos posible.

Algunos de los métodos de procesamiento de muestras biológicas más empleados son:

Filtración: Consiste en el proceso de pasar el fluido por una membrana que permita el paso del fármaco, reteniendo la mayor cantidad de otras sustancias posibles. A pesar de ser un método muy sencillo, es raramente usado por sí solo, en tanto que presenta numerosos problemas, que pueden ir desde retener muy pocos componentes de la matriz biológica, hasta retener el fármaco de interés.

Precipitación de proteínas: Consiste en un tratamiento, químico y/o físico, en el cual se desnaturalizan y precipitan proteínas de la matriz biológica, de manera que pueden ser separadas del líquido por centrifugación.

Existen muchas metodologías para lograr esto, que van desde procesos físicos, como calentamiento o ciclos de congelación y descongelación, de poca eficiencia y que pueden degradar los compuestos de interés, al uso de agentes químicos, como son el sulfato de amonio, el ácido metafosfórico, el ácido perclórico, el etanol, el acetonitrilo, y el cloruro de amonio.

Regularmente la precipitación de proteínas puede servir como un paso previo a un proceso de extracción, aunque regularmente no se emplea por sí sola, ya que una cantidad importante de componentes de la matriz biológica no son eliminados de esta manera, y pueden interferir con el proceso de cuantificación, y en algunos casos, incluso ser dañinos para los equipos analíticos.

Extracción en fase sólida: Se basa en la separación de los componentes de una mezcla por la diferencia de velocidad de migración de las moléculas de los componentes a través de una fase sólida. En este sentido, puede considerarse un método cromatográfico preparativo, similar a la filtración, pero de mucha mayor eficiencia. En el proceso, la fase estacionaria (regularmente un cartucho) es acondicionado con un disolvente apropiado; posteriormente se eluye la muestra biológica, se retiran las impurezas con un disolvente de lavado y se eluye el compuesto de interés con un disolvente final.

A pesar de tener muchas ventajas, como un bajo consumo de disolventes orgánicos, una alta reproducibilidad, en parte por no requerir mucha manipulación del analista, y ser automatizable, su costo es elevado. Los cartuchos de extracción son esencialmente desechables y no se pueden reutilizar para analizar más de unas cuantas muestras, lo que aumenta sustancialmente el costo del proceso.

Extracción líquido-líquido: Consiste en el paso del analito de la matriz orgánica a una fase orgánica, por el principio de mayor afinidad de un compuesto no ionizado por los disolventes apolares que a los polares (como es el caso de las matrices biológicas).

Existen problemas con éste tipo de métodos. En su mayoría son poco ecológicos, al emplearse volúmenes grandes de disolventes orgánicos. Su eficiencia depende en gran medida de la habilidad del analista, lo que afecta negativamente su reproducibilidad. Existen muchas condiciones de extracción, como volúmenes de muestra y disolventes orgánicos, la agitación (que puede generar emulsiones), el mecanismo de separación de las fases, y las condiciones de pH, las cuales todas actúan como variables que afectan al método, lo que hace que la optimización de éste sea más difícil. Los métodos de extracción líquido-líquido suelen requerir más tiempo que los métodos de extracción en fase sólida, y tienen más pasos, lo que da mayor oportunidad de errores experimentales.

Sin embargo, los métodos de extracción líquido-líquido son muy económicos, y las condiciones de uno pueden ser fácilmente adaptadas de un laboratorio a otro, lo que facilita la transferencia de tecnología de manera económica. Asimismo, un método de extracción líquido-líquido generalmente obtiene el fármaco no ionizado en un disolvente orgánico, el cual puede ser evaporado para reconcentrar el fármaco, aumentando la concentración de la muestra a analizar.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución^{14,15,16,17,18}:

Cromatografía es el nombre con el que se conoce al conjunto de técnicas basadas en la separación de mezclas por sus propiedades de adhesión a sustratos.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR o HPLC, por sus siglas en inglés) es una técnica de cromatografía en la cual los analitos avanzan en un medio líquido (fase móvil) a través de un sustrato sólido estacionario contenido en la columna cromatográfica. A diferencia de otros tipos de cromatografía, la presión que impulsa el líquido es generada por una bomba, lo que se traduce en altas presiones (la P en HPLC ocasionalmente representa presión). La teoría indica que dependiendo de la afinidad del analito por la fase móvil y la fase estacionaria, cada analito eluirá en un tiempo distinto (tiempo de retención).

Históricamente se emplearon fases estacionarias hidrofílicas y fases móviles hidrofóbicas, lo que se conoce como fase normal. En la actualidad la mayor parte de las técnicas de CLAR involucran fases estacionarias hidrofóbicas y fases móviles hidrofílicas, lo que se conoce como fase reversa.

El sistema consiste entonces en una bomba que impulsa el líquido, conteniendo la muestra analítica introducida por medio de un inyector, a través de las tuberías hacia la columna cromatográfica, donde la separación se lleva a cabo, para posteriormente llegar a un detector capaz de generar una señal que puede ser cuantificada e integrada en un cromatograma. En la actualidad, esta integración es llevada a cabo por una computadora.

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica altamente empleada por las ventajas que ofrece. Es una técnica altamente versátil, que puede ser adaptada a necesidades analíticas muy diferentes. Tiene alta sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión, y es generalmente muy sensible. Dados los avances tecnológicos, los equipos pueden ser altamente automatizados, lo que reduce los tiempos de análisis y reduce los debidos al operador. Debido a que se trata de una técnica de separación, se vuelve una de las técnicas más empleadas para la cuantificación de analitos que se encuentran en matrices complejas, en las que hay más de un analito, como los fluidos biológicos.

Partes del equipo:

Bombas: las bombas para CLAR generalmente producen presiones de al menos 6000 psi, y pueden impulsar los líquidos a flujos de entre 0.1 y 10 ml/min. Sus partes internas son resistentes a la corrosión e inertes a la mayoría de disolventes empleados. A diferencia de bombas de líquidos para otros propósitos, la velocidad de flujo de las bombas cromatográficas debe ser constante y reproducible en todo momento.

Para el uso en aplicaciones farmacéuticas, existen dos mecanismos de bombeo principales: mecánicos y neumáticos.

Las bombas mecánicas usan generalmente un sistema de pistones recíprocos, en las cuales un émbolo de zafiro es impulsado por un motor a una cámara llena de líquido, de manera que la presión generada hace avanzar la fase móvil. Válvulas de retención ("check valves") evitan que el flujo de la fase móvil regrese a la cámara y al émbolo, asegurando un flujo constante. Las pulsaciones ocasionadas por la entrada y salida del émbolo pueden generar fluctuaciones en la presión y por ende en la señal, por lo que ocasionalmente se emplean mecanismos que corrijan éste efecto, como el empleo de dos cámaras de líquidos, tales que cuando una está llenándose, la otra está enviando el flujo.

Las bombas neumáticas aseguran una presión constante. Existen dos mecanismos empleados en aplicaciones farmacéuticas: bombas de desplazamiento de gas, en las que la presión de un gas comprimido fuerza el solvente fuera del tubo que lo contiene, o un mecanismo de amplificación neumática, en el que el gas impulsa un pistón de manera que éste impulsa el líquido. La principal ventaja de las bombas neumáticas es que no requieren mecanismos que corrijan fluctuaciones de presión, en tanto que la presión del gas es constante y se transfiere directamente a la presión del líquido.

Sistemas de inyección: Son empleados para introducir las muestras en el sistema cromatográfico. En la actualidad existen dos tipos: jeringas manuales y autoinyectores. Las jeringas manuales tienen el problema de requerir operación constante del analista, por lo que no son empleadas para el análisis de cantidades grandes de muestras.

Los autoinyectores, por su parte, permiten el análisis de forma automatizada de diferentes muestras almacenadas en el mismo, de manera que se pueden programar para realizar corridas cromatográficas completas sin intervención humana, reduciendo el tiempo de interacción del analista con el sistema y de igual manera aumentando la repetibilidad del método. Consisten en un mecanismo robótico que opera una jeringa, la cual coloca la muestra en un aro ("loop") colocado en un bloque de teflón y acero inoxidable. Una válvula mantiene el flujo de fase móvil sin pasar por éste aro, hasta que la muestra es llenada; en ese momento, la válvula pasa a la posición de inyección y permite la entrada de la muestra al sistema cromatográfico.

Tubería y uniones: Fabricadas de materiales inertes, estas tuberías tienen diámetros pequeños, de manera que influyen en la velocidad de flujo. La tubería de cada sistema cromatográfico puede ser distinta en material, tamaño y longitud, lo que puede generar que haya variaciones en los tiempos de retención de los analitos, aun al adaptar de manera idéntica una metodología analítica de un cromatógrafo a otro.

Disolventes: Los disolventes empleados para la cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa son regularmente agua y disolventes de baja reactividad, que son mezclados en distinta proporción. La sensibilidad de los equipos de CLAR a sustancias extrañas, como gases disueltos o partículas, es muy alta, de manera que los disolventes son de la pureza más alta, *grado HPLC*, o agua desionizada.

Los recipientes en los que estos se almacenan (ya sea mezclados o por separado, de contarse con un sistema automatizado de mezclado) son también inertes y cerrados o provistos de filtros para evitar la entrada de gases disueltos en los líquidos. En farmacia, regularmente se emplean recipientes de vidrio o de acero inoxidable de una capacidad de 1 a 2 litros. Para evitar esta entrada de burbujas de aire, los disolventes son sometidos a procesos de desgasificación, como la sonicación, vacío, o purgado con helio; asimismo, se colocan filtros en la entrada de las tuberías que alimentan la bomba, para evitar la entrada de burbujas y partículas.

Columna cromatográfica: Posiblemente el componente primordial del sistema cromatográfico, en tanto que es donde se lleva a cabo la separación de los analitos.

En la actualidad, las columnas cromatográficas son tubos de acero inoxidable empacadas con partículas muy pequeñas de materiales rígidos y porosos. Los materiales empacados se mantienen en su lugar con terminaciones porosas (de 0.2 a 0.5 μm) que permiten la entrada y salida de fases móviles sin permitir la salida del material de empaque.

Como se mencionó anteriormente, la fase estacionaria, o más formalmente, el tipo de interacciones moleculares que promueve la fase estacionaria, define el tipo de cromatografía que se está llevando a cabo. En la actualidad existen cuatro tipos principales de cromatografía: fase normal (una fase polar promueve interacciones polares), fase reversa (la fase apolar promueve interacciones dispersivas), intercambio iónico (interacciones iónicas), y exclusión de tamaño (no hay interacciones moleculares, únicamente diferencia en los tamaños moleculares).

En la cromatografía de fase reversa, la fase estacionaria recurrentemente consiste en un compuesto poroso unido por enlaces covalentes a un segundo sustrato no polar.

Dependiendo de la naturaleza del compuesto poroso, se pueden clasificar en microesferas totalmente porosas, las más populares al ofrecer buena eficacia, durabilidad y costo, partículas micro vellosas, empleadas principalmente para separación de macromoléculas, y partículas de perfusión, empleadas únicamente en cromatografía preparativa de macromoléculas.

Las primeras fases estacionarias para cromatografía de fase reverse consistían en microesferas de sílica unidas a una cadena de octadecil silanol (C18).

En la actualidad, existen diferentes sustratos no polares empleados, que pueden ser alifáticos o fenílicos. Casi un 80% de las aplicaciones de HPLC farmacéuticas han sido desarrolladas empleando columnas que usan C18 o C8 (octilsilanol), aunque también existen aplicaciones de C1 y C4, así como fenilsilanoles y alquilsilanoles fluorados.

El principal problema que presentan el uso de sílica es el limitado rango de pH que pueden soportar sin degradarse. Regularmente se recomienda su uso en rangos de pH de 2 a 7. Un valor menor de pH puede promover la hidrólisis del grupo unido a la sílica, mientras que pH mayor a 7 puede promover la solubilización de la sílica en disolventes polares. La solución a éste problema se ofrece como columnas en las que las partículas porosas son basadas en carbono, zirconio, o polímeros complejos. Éstas columnas permiten operar en rangos de pH mayores, pero a costa de una menor eficiencia y la posibilidad de unión irreversible de los analitos con la columna, por lo que su uso en el área farmacéutica es escaso.

No todas las columnas cromatográficas son iguales. A parte del tipo de cadena apolar unida al sustrato poroso, las columnas varían en diferentes parámetros:

Longitud: El más evidente a simple vista, la longitud de la columna afecta el tiempo de elusión de manera lógica, al modificar la longitud total del recorrido de la muestra. En la actualidad se han reducido las longitudes de las columnas, lo que se ha traducido en menores tiempos de análisis.

Diámetro interno: El diámetro interno de una columna puede modificar la sensibilidad y capacidad de separación. Regularmente los diámetros internos para cromatografía líquida de alta resolución pueden ir desde 1 a 4.6 mm, siendo éste último el más popular en la actualidad para aplicaciones farmacéuticas, mientras el tamaño más reducido es de uso casi exclusivo para aplicaciones cromatográficas acopladas a espectrometría de masas.

Tamaño de partícula: El tamaño de la partícula de fase estacionaria es inversamente proporcional a la capacidad de separación de la columna, ya que al reducirse el tamaño aumenta la superficie de contacto con el analito. Regularmente se emplean partículas de 5µm, ya que partículas menores aumentan los requerimientos de presión del sistema cromatográfico.

Tamaño de poro: La mayoría de las fases estacionarias son porosas para aumentar la superficie de contacto. Los tamaños de poro grandes pueden facilitar la separación de los analitos, pero tamaños ligeramente más grandes a los del analito pueden ocasionar que el analito permanezca en ellos, sin salir de la columna.

Detector: Es el instrumento involucrado en la obtención de la señal cuantificable que permite identificar los compuestos analizados. Existen diferentes tipos de detector, como pueden ser detectores de fluorescencia, índice refractivo, dispersión de luz,

espectrómetros de masas, entre otros. A continuación se presenta una tabla con algunos de los detectores empleados en aplicaciones farmacéuticas.

Tabla 1: Detectores empleados en cromatografía líquida de alta resolución

Detector	Límite de detección (ng)	Mecanismo	Ventajas y desventajas
Absorción UV-Visible	0.1-1	Emplea lámparas de tungsteno y deuterio que envían ondas electromagnéticas (con longitudes de onda de 390-750 nm para la primera, 10-390 nm para la segunda). La longitud de onda puede ser seleccionada con un monocromador para ser detectada por un fotodiodo, o bien emplear una fila de fotodiodos para detectar todo el espectro de absorción del analito.	Puede ser empleado para una gran cantidad de sustancias. Es un mecanismo selectivo, que puede discernir entre analitos, aunque puede detectar absorción de la fase móvil. Presenta una relación lineal entre concentración y respuesta en el intervalo establecido por la ley de Lambert y Beer. Económico
Absorción Infrarroja	100-1000	Emplea radiación electromagnética de una longitud de onda de 0.8-2.5 μm . Esta radiación es absorbida por los enlaces de las moléculas; existen señales características para diferentes enlaces. El método de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier emplea un interferómetro para bombardear la muestra con diferentes longitudes de onda en un corto tiempo, y comparar la interferencia generada por la muestra con la señal de la onda sin interferir. Empleando el algoritmo matemático de la transformada de Fourier, es posible convertir estas señales de interferencia en señales de absorción para cada longitud de onda. De	Método rápido. Requiere el uso de un patrón para identificar la muestra en función de su espectro de absorción. Por lo anterior, su principal uso farmacéutico es en el análisis de materia prima. También puede ser empleado para la identificación de productos de degradación de fármacos en productos terminados.

		esta manera es posible obtener un espectro de absorción, y dilucidar la estructura de la misma.	
Fluorometría	0.001-0.01	Excita la fase móvil y la muestra con un láser, y mide la fluorescencia que se origina.	Solo son útiles para analitos que presentan fluorescencia, o que han sido modificados (derivatizados) con unión covalente a grupos fluorescentes.
Índice de refracción	100-1000	Envía un haz de luz a dos celdas, una por la que pasa disolvente puro y otra por la que pasa la fase móvil que arrastra la muestra, de manera que el haz excita un fotosensor. Al momento de pasar la muestra, la luz se refracta y el fotosensor detecta menor cantidad de luz.	Muy poco sensible y no es selectivo. Detecta todo tipo de muestras. Muy económico.
Dispersión de luz	0.1-1	La fase móvil con la muestra es nebulizada y pasada por un tubo caliente, en el cual la fase móvil se evapora y se obtienen partículas sólidas que dispersan la luz láser a un fotodiodo.	El detector responde a la masa del analito, y no a su estructura molecular. Las curvas de calibración no son generalmente lineales, por lo que se tienen que ajustar a modelos polinomiales. No detecta señales de los disolventes que componen la fase móvil. No permiten el uso de soluciones tampón que no sean volátiles como fase móvil.
Electroquímico	0.01-1	Mide la corriente que pasa entre un electrodo de trabajo y un electrodo auxiliar al llevarse a cabo una reacción de óxido-reducción del analito.	Presenta linealidad entre la respuesta de corriente y la concentración. Es selectivo, pero solo funciona para especies que son reducibles u oxidables. Sensible a cambios de flujo y temperatura.
Espectrometría de masas	0.1-1	Permite medir el <i>radio masa-a-carga</i> de partículas ionizadas.	El método es extremadamente rápido, lo que reduce

		<p>La muestra es vaporizada y posteriormente ionizada, generando fragmentos iónicos, los cuales son separados por campos electromagnéticos y detectados por un multiplicador de electrones, que genera una señal eléctrica cuantitativa a partir de las cargas que lo impactan.</p> <p>Existen diferentes tipos de espectrometría de masas. En aplicaciones farmacocinéticas, lo más empleado es la espectrometría de masas en tándem usando un cuadrupolo, que separa los fragmentos iónicos en función de su estabilidad en diferentes campos eléctricos; empleando ésta técnica pueden identificarse los fragmentos relacionados con el analito de interés, y posteriormente cuantificarse empleando una fragmentación sucesiva</p>	<p>costos de operación. Debido a que la detección en si es selectiva, permite que el proceso cromatográfico sea más rápido y requiera menores flujos y por consiguiente menores volúmenes de disolventes.</p> <p>Éste detector tiene un costo mucho más elevado que los descritos anteriormente, principalmente porque se trata de un equipo completo que es acoplado al sistema cromatográfico. Su costo de mantenimiento también es mucho más elevado. Asimismo, su operación es más delicada y requiere de capacitación adicional del personal y de instalaciones adecuadas para su correcto funcionamiento.</p> <p>El fenómeno de supresión iónica, en el cual un compuesto coeluido con el analito de interés reduce la capacidad de ionización de éste último, puede reducir la señal obtenida por ésta técnica, por lo que debe considerarse durante el desarrollo de metodologías que empleen detección por masas.</p>
--	--	--	--

El detector de UV/visible tiene una capacidad de detección suficiente para aplicaciones farmacocinéticas, en tanto que puede detectar compuestos en el rango de concentración de microgramos sobre mililitros. A su vez, es relativamente económico y es un detector selectivo, lo que lo hacen una buena primera opción para el desarrollo de metodologías de cuantificación de fármacos en fluidos biológicos.

Validación de Métodos Analíticos^{6, 19, 20}:

El aseguramiento de la calidad consiste en el establecimiento de programas de monitoreo sistemático y evaluación de los pasos involucrados en la generación de un producto o servicio.

La industria farmacéutica ha adaptado mecanismos de aseguramiento de la calidad, en función de que un proceso de control de calidad (donde se retiran los elementos deficientes producidos) no es suficiente para garantizar que los productos que genera sean completamente inocuos y eficientes para salvaguardar la salud de los consumidores finales.

Por lo anterior, la industria farmacéutica en la actualidad es de las industrias con mayores requerimientos de calidad. Para asegurar que éstos requerimientos son cumplidos en su totalidad, todos los procesos son sometidos a un esquema de validación.

La validación es el proceso de obtener evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado. La ISO 9000:2000 define la validación como "la confirmación, por medio de la entrega de evidencia objetiva documentada, de que los requisitos para una aplicación o uso específico han sido cumplidos."

La validación de procesos es requerida por la mayoría de cuerpos regulatorios gubernamentales. La segunda principal motivación de las industrias para realizar validación de sus metodologías es el aseguramiento de la calidad de sus productos y la reducción de costos; un proceso validado garantiza que siempre producirá resultados confiables, de manera que se reduce la necesidad de repetir los procesos por errores que pudieran generar duda razonable de la fiabilidad del producto.

Los métodos analíticos son considerados un proceso para la industria farmacéutica, en tanto que permiten la cuantificación de una especie química. Un método analítico puede ser empleado dentro del aseguramiento de la calidad de un producto, desde la determinación de cantidad de un fármaco en una preparación, hasta, como es el objetivo del presente trabajo, la determinación de la bioequivalencia entre dos productos diferentes.

Un método analítico requiere ser validado para demostrar que es adecuado para la determinación cuantitativa del analito.

Tanto la Guía para la Industria de la FDA para validación de métodos bioanalíticos, como la NOM-177-SSA1-1998, establecen una serie de parámetros fundamentales que debe cumplir un método. Estos son:

Selectividad: Capacidad del método analítico de diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros compuestos en la muestra.

Exactitud: Concordancia de los resultados obtenidos experimentales al valor de referencia del analito.

Precisión: Concordancia de mediciones individuales de un analito cuando el proceso es aplicado repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

Repetibilidad: Precisión de método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

Reproducibilidad intralaboratorio: Precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, como días, equipos, o analistas diferentes.

Recuperación o recobro absoluto: Eficiencia porcentual de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.

Linealidad: Capacidad de un método analítico para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de la muestra en un rango de trabajo.

Límite de cuantificación: concentración más baja del compuesto que puede ser cuantificado cumpliendo con precisión y exactitud establecidas en el método.

Estabilidad: Capacidad del analito de interés de conservar sus características desde el momento de muestreo hasta el análisis. Se encuentra en función de las condiciones de almacenamiento, y las propiedades químicas de la matriz y el mismo analito. La determinación de estabilidad en ciertas condiciones no es extrapolable a condiciones distintas, por lo que se debe establecer para cada una de las condiciones a las cuales está expuesta la muestra durante el proceso analítico

La NOM-177-SSA1-1998 contiene un apartado de definiciones de términos empleados en el proceso de validación. A continuación se recopilan los que son empleados en el presente trabajo.

Corrida analítica: Conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales

Material de referencia: Material o sustancia en el cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos, para ser utilizados para la calibración de aparatos, la evaluación de un método de medición o para asignar valores a los materiales

Matriz biológica: Material de origen biológico en el cual se encuentra la sustancia de interés

Muestras control de calidad: Las muestras de concentración conocida que se cuantifican durante la corrida analítica para corroborar la validez del método

Medicamento de referencia: medicamento indicado por la Secretaría de Salud como tal, que cuenta con el registro de dicha dependencia, se encuentra disponible comercialmente y cuya bioequivalencia está determinada.

Equivalente farmacéutico: Medicamentos que contienen la misma cantidad de la misma sustancia o sustancias activas, en la misma forma farmacéutica, que cumplen con las especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Capítulo 3: Parte Experimental

3.1 Equipo:

Cromatógrafo de líquidos Shimadzu 10A
Columna Hypersil ODS 150x4.6 mm (ThermoQuest)
Columna LiChrospher RP-18 250x4 mm (CROM)
Columna LiChrosorb 100 RP-18 250x4 mm (CROM)
Potenciómetro ThermoOrion 410
Balanza analítica Sartorius A210
Centrifuga Eppendorf S20

3.2 Reactivos:

Acetonitrilo grado HPLC JT Baker
Ácido acético glacial JT Baker grado reactivo
Acetato de Etilo grado reactivo Mallinckrodt
Acetato de sodio anhidro JT Baker
Agua desionizada con sistema Micropore
Metanol grado HPLC JT Baker

Estándares:

Diclofenaco Sódico, Novartis , lote H1521, pureza 100.0%
Paracetamol, Cosufar, lote 32A0, pureza 99.80%
Ketoprofeno, Grin, lote TB07003, pureza 100.75%
Naproxeno sódico, Cosufar, lote 08-409, pureza 100.0%

3.3 Método analítico para la cuantificación de diclofenaco sódico en plasma:

3.3.1 Revisión de la literatura

Para el desarrollo del método analítico inicialmente se consultó la literatura relacionada con el fármaco. Se revisaron métodos analíticos publicados en la literatura científica que emplearan cromatografía de líquidos para cuantificar diclofenaco, o bien reportaran un método de extracción del fármaco de fluidos biológicos, o ambas.

La información obtenida de los artículos que se presentan a continuación sirvió como base para establecer las condiciones de prueba del método analítico a desarrollarse.

Tabla 2: Métodos reportados en la bibliografía

Método	Volumen de muestra	Extracción del plasma	Columna	Fase móvil	Rango de concentración	recobro	Std interno	Detección UV
B. Mayer, <i>et al</i> ²¹		Microdialisis de muestras de tejido adiposo subcutáneo inyectadas directamente	Luna C8(2) (100_2.0 mm, 3 mm; Phenomenex	acetonitrilo_agua_ácido acético_trietilamina (200:791:18.8:17.0:65, v/v/v/v, pH= 3.6)	1.2-1250 ng/ml	-	Indometacina 250 ng/ml	280 nm
A. Parusa, <i>et al</i> ²²	-	Muestras en solución a partir de preparaciones farmacéuticas sólidas	Agilent Zorbax Eclipse XDB C-18 (150mmx4.6 mm, 5µm)	Gradiente de Acetonitrilo-agua	50-400µg/mL	-	Ácido benzóico 100µg/mL	245 nm
C. García, <i>et al</i> ²³	-	Inyección directa de colino	Lichrosphere 100 RP-8 endcapped (5 µm) (250 x 4 mm)	fosfato de sodio a pH 2,5:metanol (34:60)	0.06-0.14 g/100 g de colino	100.25%	-	254 nm
R. Hajkova, <i>et al</i> ²⁴	-	Centrifugación de un gel e inyección directa de sobrenadante	SUPELCO Discovery C18	metanol/buffer fosfato, pH 2.5 (65:35)	0.2-1.5 g/100 g de gel	93.5%	Flurbiprofeno 10 µg/mL	245 nm
M. Sultan, <i>et al</i> ²⁵	0.5ml	Sangre completa: Añadir 10µl SI, y 20 µl de standard; hemolizar con 0.9 ml de agua. Agitar 5min, sonicar 5min, dejar a Tamb. 5min. Acidificar con 0.3 ml HCl 3M. Agregar 6ml de cloruro de metileno. Centrifugar 5min a 1930 g. Separar el cloruro de metileno y evaporar. Reconstituir con 50 µl de fase móvil.	LICHROSphere RP18 column	Gradiente de acetato de amonio 20 mM pH 3.7 y acetonitrilo	2-4 µg/mL	93.5%	Ácido salicílico 1 mg/ml	246 nm
Y. Sun, <i>et al</i> ²⁶	100 µl	Agregar 200µl de buffer de fosfato (pH 2.5, 50mM) y 700 µl de acetato de etilo. mezclar en vórtex 1min. Centrifugar	Daisopak ODS (SP-120-5-ODS-BP, 250_4.6 mm)	acetonitrilo-buffer acetato (pH 3.5, 0.1 M)-metanol (35:40:25)	0.1-100 µg/ml	89.4%	Mefanamico 2.0 µg/ml	274nm

		1000g/10min. Separar 600 µl de fase orgánica. Repetir extracción y evaporar. Agregar 200 µl de fase móvil, centrifugar a igual condición. Inyectar 20 µl de sobrenadante.						
P. Zorica, et al ²⁷	1 ml (sangre de puerco)	1 ml de suero, añadir estándar interno. Agregar 2ml ácido fosfórico (2.5M), 5ml hexano -alcohol isopropílico (9:1). Mezclar y centrifugar 1000g/10min. Evaporar. Reconstituir en 200 µl fase móvil vortexeando 30s, inyectar 20 µl.	Supelcosil LC-18 (250 x 4.6 mm; 5 µm).	Acetonitrilo-metanol-Acetato de sodio 0.1M (25 : 30 : 45, v/v), pH 7.3 (ajustado con ácido acético glacial).	0.02-1.8 mg/L	94%	Flurbiprofeno (No reportado)	226nm
C. Arcelloni, et al ²⁸	1ml	Extracción sólida con cartuchos Abselet (Nexus bonded phase, 30 mg). Preextracción, añade 100µg std int, 100µl HCl 7M, y diluir con 1ml de agua. Centrifugar 4000rpm/10min. Extraer en cartucho.	C (250 mmx3.6 mm 18 I.D., 5 µm)	KH PO ₄ 25 mM, pH 2.4 2.1. 3.5)-acetonitrilo (30:70)	5-3000 ng/ml	100%	Ibuprofeno 5 mg/ml	280nm
A. Schneeweis et al ²⁹	0.5 ml	Mezclar con 0.5 ml acetonitrilo. Agitar a 400mov/min. Centrifugar 12000rpm/15min e inyectar sobrenadante.	ODS 5µm, 125 x 4 mm) con columna guardia.	Acetonitrilo: Agua:Ácido acético (60:40:2)	-	-	-	261 nmj
B. Hinz, et al ³⁰	0.5 ml	Agregar a muestra 1ml de ácido fosfórico 1µM, y 50 µl std interno. Agregar 5ml de diclorometano y extraer 15min a agitación constante. Centrifugar. Transferir fase orgánica y evaporar, disolver el 250µl de fase móvil.	(CC 125/4 Nucleosil 120-3 C8, Machery-Nagel, Düren, Germany), con precolumna C8	Acetonitrilo: buffer fosfato (22.5: 77.5)	25-2500 µg/ml)	-	Ácido niflúmico (10 µg/ml en buffer de acetato 0.03 M)	282 nm

3.3.2 Diseño de curva de calibración y puntos control:

El rango de la curva de calibración se basó en la información de la farmacocinética del diclofenaco en la literatura, en la que se reporta que la concentración plasmática máxima es de $1.5 \mu\text{g/ml}$ ⁷. Por lo anterior, se consideró el valor más alto una concentración de 200% éste valor y la concentración más baja un 10% del mismo, es decir, de $3.0 \mu\text{g/ml}$ a $0.15 \mu\text{g/ml}$.

Los valores de la curva de calibración se establecieron en función de la facilidad de prepararlos, por lo que las concentraciones finales fueron las siguientes: , 0.15 , 0.3 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , y $3.0 \mu\text{g/ml}$

Los puntos control se seleccionaron de la siguiente manera: $2.5 \mu\text{g/ml}$ (próximo al 85% del valor máximo de la curva) para el punto control Alto; como punto control Medio, la concentración de $1.5 \mu\text{g/ml}$, y $0.45 \mu\text{g/ml}$, como punto control Bajo, el cual equivale al triple de concentración del punto mínimo de la curva de calibración,

El diagrama siguiente muestra una representación gráfica de cómo se preparó la curva patrón.

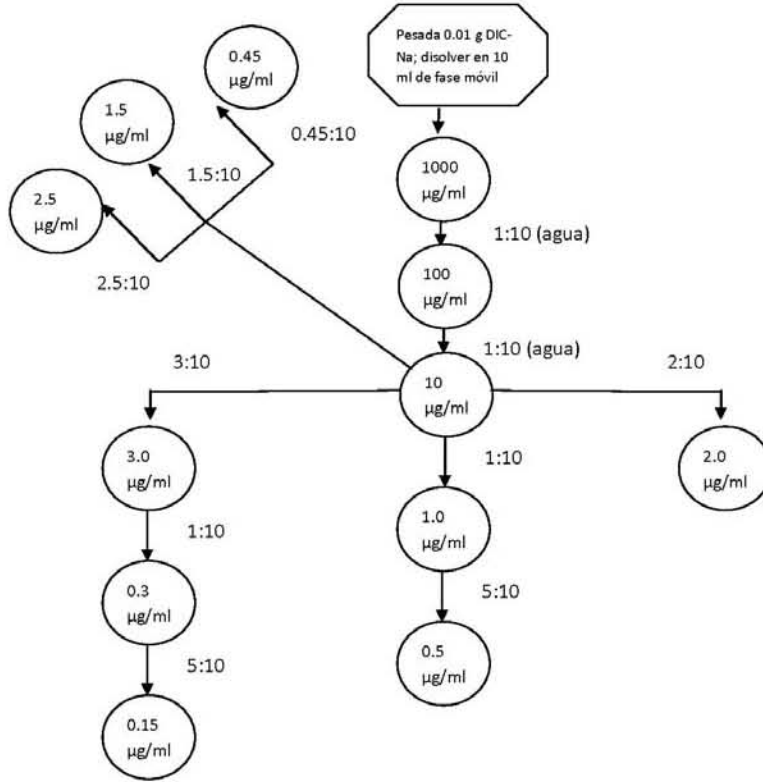
Se realizó una pesada exacta de 0.01 g de diclofenaco sódico, el cual se disolvió en 10 ml de la fase móvil, constituyendo ésta la solución stock contiene $1000 \mu\text{g/ml}$.

A partir de éste stock se realizaron dos diluciones decimales (1 ml de la solución anterior que se llevaron a un volumen de 10 ml con agua) para obtener una solución de $10 \mu\text{g/ml}$.

Usando alícuotas de ésta solución de $10 \mu\text{g/ml}$ descritas en el diagrama, y aforando a 10 ml con agua, se prepararon las soluciones de puntos control y los puntos de la curva de 1 , 2 , y $3 \mu\text{g/ml}$. De igual manera, empleando alícuotas de éstas soluciones subsecuentes, se prepararon los demás puntos de la curva.

Para la preparación de curvas de calibración en plasma, las soluciones de concentración menor a $10 \mu\text{g/ml}$ fueron llevadas al aforo con plasma.

Diagrama 1: Preparación de Curva Patrón de diclofenaco



Nota:

Toda dilución posterior a la concentración de 10 µg/ml se realizó en agua o plasma según se necesitara.

3.3.3 Desarrollo del método analítico

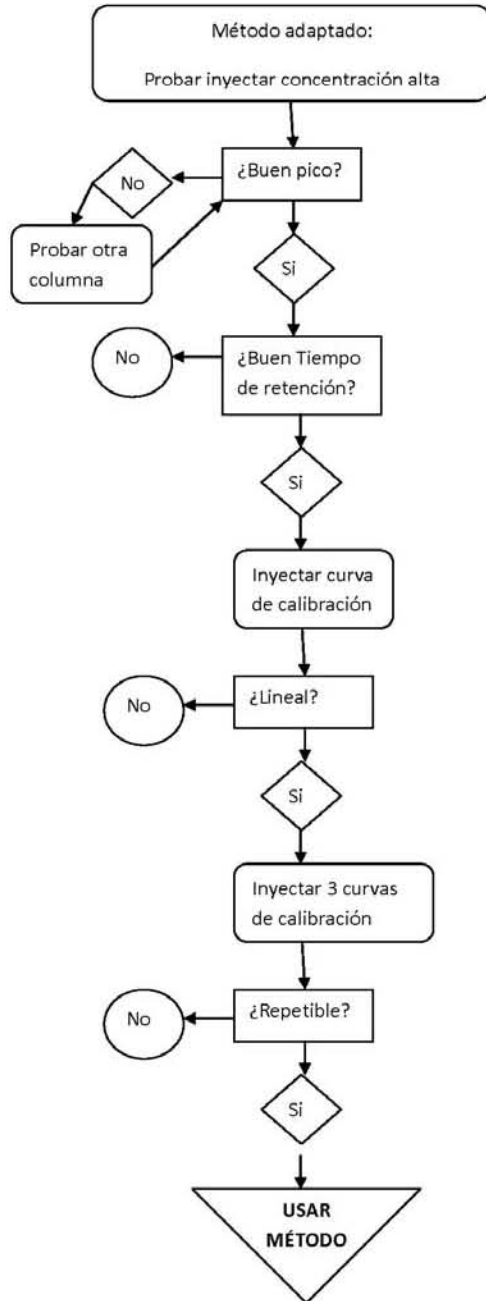
Para el desarrollo del método, se evaluaron las siguientes fases móviles y columnas cromatográficas (Tabla 3). Para todas las pruebas se empleó una solución de diclofenaco sódico a una concentración de 1.5 µg/ml, un flujo de 1.0 ml/min, un volumen de inyección de 50µl, y detección UV a 278 nm.

Tabla 3: Métodos cromatográficos a probar

Fase Móvil	Columnas probadas
ACN:MetOH: Acetato de sodio 0.1M (25:30:45) pH=7.9	LiChrosorb, LiChrospher
ACN: Acetato de sodio 0.1 M (45:55) pH=7.7	LiChrosorb, LiChrospher
MetOH: Acetato de sodio 0.1 M (45:55) pH= 7.4	LiChrospher
ACN:H ₂ O:Ácido acético glacial (60:40:2) pH 2.8	LiChrospher,
Hypersil ODS	Hypersil ODS

El algoritmo utilizado para la selección del mejor método cromatográfico se presenta en el diagrama 2

Diagrama 2: Algoritmo para seleccionar las condiciones cromatográficas



3.3.4 Evaluación de Métodos de Extracción:

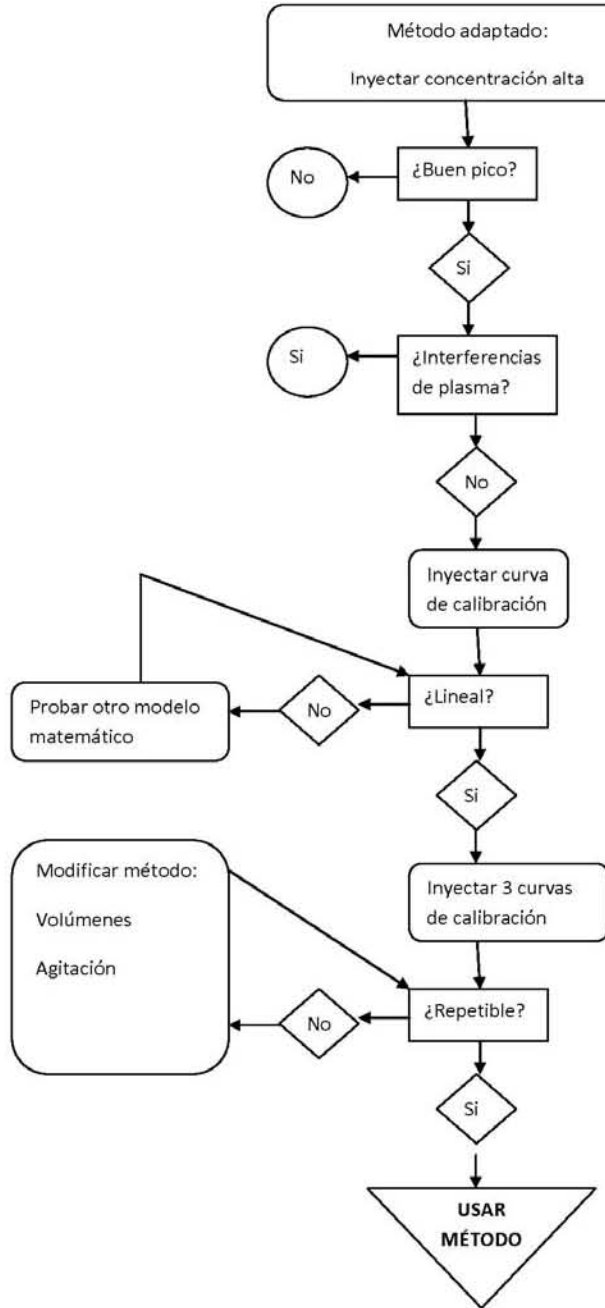
Con el fin de contar con un método de extracción adecuado para la extracción del fármaco del plasma, se probaron los disolventes que se presentan en la tabla 4.

Tabla 4: Métodos de extracción probados:

Metodología de extracción	Autor	Condiciones de extracción
Precipitación de proteínas plasmáticas con acetonitrilo, agitación y centrifugación	Schneeweis ²⁹	Plasma:ACN (5ml:5ml), agitación en vórtex, centrifugación 10000rpm/10min
Extracción orgánica en éter etílico, con plasma acidificado. Reconstitución en fase móvil	Sun ²⁶	Plasma:Ácido Fosfórico 2.5 M: éter etílico (300:150:600 µl); Mezclar en tubo Eppendorf y agitar en vórtex a velocidad 7 por 1min. Centrifugar a 10000rpm/10min; evaporar y reconstituir en igual volumen de fase móvil que plasma usado
Extracción orgánica en acetato de etilo, con plasma acidificado. Reconstitución en fase móvil	Zorica ²⁷	Plasma:Ácido Fosfórico 2.5 M: acetato de etilo (1:0.6:3 v.v.v); agitación horizontal a 130 mov/min por 15min, centrifugación 5000rpm/10min; evaporar y reconstituir en igual volumen de fase móvil que plasma usado

Para seleccionar el proceso más adecuado, se utilizó el algoritmo que se presenta en el diagrama 3

Diagrama 3: Prueba de métodos de extracción



3.4 Validación del método analítico:

Los parámetros empleados para validar el método analítico, y las metodologías seguidas para evaluarlos, fueron los siguientes.

3.4.1 Selectividad:

Se prepararon y se inyectaron al sistema cromatográfico muestras de las siguientes características:

Muestra blanco de reactivos (fase móvil)

Muestra blanco de *pool* de plasma procesada de acuerdo al método

Muestra de diclofenaco sódico disuelto en fase móvil (10 µg/ml)

Muestra de diclofenaco sódico disuelto en plasma (1 µg/ml) procesada de acuerdo al método

Muestras de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) disueltos en fase móvil: ketoprofeno, paracetamol, naproxeno sódico (5 µg/ml)

Criterio de aceptación: Que no exista una señal que se encuentre en el mismo tiempo de retención que el pico de diclofenaco sódico.

3.4.2 Linealidad:

Se prepararon 3 curvas de calibración en el rango de 0.15 a 3.0 µg/ml, las cuales se procesaron empleando el método desarrollado y se inyectaron al cromatógrafo.

Para evaluar la respuesta cromatográfica se consideró la altura del pico, la cual se graficó contra la concentración.

Se seleccionó el modelo matemático al que mejor se ajustara la curva.

Criterio de aceptación: Para cada curva, el coeficiente de determinación R^2 es igual o mayor a 0.9800

3.4.3 Precisión:

Precisión: Repetibilidad:

Se prepararon por quintuplicado puntos de control a las concentraciones de 0.45, 1.5 y 2.5 µg/ml, y se analizaron en una misma corrida analítica junto con una curva de calibración.

Se calculó la concentración recuperada para cada nivel de concentración, interpolando la respuesta de altura de los puntos control en la curva de calibración. Se calculó el promedio, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación de cada una de las concentraciones.

Criterio de aceptación: El método es repetible si el coeficiente de variación CV% para cada una de las concentraciones no es mayor que el 15%.

Precisión: Reproducibilidad intralaboratorio:

Se prepararon puntos control por duplicado durante 3 días, las cuales se inyectaron al sistema cromatográfico. Los resultados de respuesta (alturas) se interpolaron en la curva de calibración preparada cada día de análisis.

Se calculó la concentración recuperada para cada muestra, y a partir de éstas el promedio, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación en cada una de las concentraciones.

Criterio de aceptación: El método es repetible si el coeficiente de variación CV% para cada una de las concentraciones no es mayor que el 15%.

3.4.4 Exactitud:

Empleando los valores obtenidos de los ensayos de precisión, se calculó la desviación estándar absoluta (DEA) para cada uno de ellos.

$$DEA = 100 \times \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración recuperada experimentalmente}}{\text{Concentración nominal}}$$

Criterio de aceptación: Para cada valor individual, el valor de DEA no debe ser mayor a 15%

3.4.5 Recuperación Absoluta:

Se prepararon por triplicado, muestras en plasma conteniendo los puntos control bajo medio y alto y se procesaron empleando el método desarrollado. De igual manera se prepararon por triplicado muestras de igual concentración en solución.

Se calculó el porcentaje de recobro a partir de la señal obtenida de la muestra en solución como 100%

Como las muestras extraídas se concentraron, fue necesario multiplicar la señal de la muestra en solución por el factor de concentración de la muestra en plasma. Así, el cálculo fue el siguiente:

$$\text{Porcentaje de recobro} = 100 \times \frac{\text{Altura Plasma}}{2.5 \times \text{Altura Solución}}$$

Criterio de aceptación: El porcentaje de recobro absoluto no necesariamente será del 100%, pero debe ser semejante en el todo el rango de concentraciones analizadas

3.4.6 Límites de cuantificación:

Se prepararon por quintuplicado muestras de la concentración más baja de la curva de calibración (0.15 µg/ml). De igual manera se prepararon cinco muestras de la mitad de la concentración más baja de la curva de calibración (0.075 µg/ml). Las muestras se analizaron empleando el método desarrollado.

Para cada nivel de concentración, se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: Se considera que un punto inferior de la curva equivale al límite de cuantificación cuando el CV% no es mayor del 20% y la concentración recuperada promedio se encuentra en el $\pm 20\%$ de la concentración nominal.

3.4.7 Influencia de la dilución:

Se preparó por duplicado una muestra del doble de concentración del punto control alto (2.5 µg/ml). Se diluyó la muestra a la mitad usando plasma. Las muestras se procesaron empleando el método desarrollado junto con una curva de calibración.

Los resultados de altura de las muestras se interpolaron en la curva de calibración. Se determinó la concentración real de la muestra, multiplicando por el factor de dilución. A partir de los resultados, se calculó la DEA en función de la concentración nominal original de la muestra.

Criterio de aceptación: La desviación estándar absoluta para cualquiera de los puntos no es mayor al 15%

3.4.8 Estabilidad:

Las pruebas de estabilidad determinan si la molécula es estable en diferentes condiciones.

Las pruebas que se llevaron a cabo fueron las siguientes: Estabilidad de la muestra procesada en el autoinyector (3 horas), estabilidad de la muestra procesada congelada (24 horas), estabilidad de la muestra en mesa de trabajo (24 horas), estabilidad de la muestra sometida a ciclos de congelación y descongelación (24 horas c/u), y estabilidad de la muestra congelada para almacenamiento a largo plazo (1 mes). La temperatura de congelación fue de -20°C .

Para cada una de las pruebas se prepararon los puntos control (0.45, 1.5 y 2.5 µg/ml) que fueron sometidos a las condiciones descritas a continuación

En todos los casos, se preparó una curva de calibración que se inyectó conjuntamente con las muestras el día de análisis. El día del análisis se prepararon también muestras de puntos control por triplicado las cuales se procesaron e inyectaron (muestras "frescas"), en conjunto con las muestras de prueba de estabilidad.

3.4.8.1 Estabilidad de la muestra procesada en el autoinyector (3 horas):

Se prepararon por triplicado muestras de puntos control, se procesaron y dejaron , en el autoinyector por tres horas antes de inyectarlas. El tiempo de tres horas fue escogido por ser el tiempo aproximado en el que se corren tres curvas de calibración con puntos control.

3.4.8.2 Estabilidad de la muestra procesada congelada (24 horas):

Se prepararon por triplicado muestras de puntos control, se procesaron hasta antes de la reconstitución y se congelaron (-20°C) por 24 horas. Posteriormente se reconstituyeron e inyectaron al sistema cromatográfico.

3.4.8.3 Estabilidad de la muestra en mesa de trabajo (24 horas):

Se prepararon por duplicado muestras de las concentraciones alta, media y baja, se mantuvieron en la mesa de trabajo por 24 horas. Posteriormente, se procesaron e inyectaron al sistema cromatográfico

3.4.8.4 Estabilidad de la muestra sometida a ciclos de congelación y descongelación (24 horas c/u):

Se prepararon por triplicado muestras de puntos control y se sometieron a congelación por 24 horas. Después de este tiempo se descongelaron. El ciclo de congelación (-20°C) - descongelación se repitió tres veces. Una vez concluido el último ciclo, se procesaron e inyectaron al sistema cromatográfico.

3.4.8.5 Estabilidad de la muestra congelada para almacenamiento a largo plazo (1 mes):

Se prepararon por triplicado muestras de puntos control , las cuales se almacenaron en congelación (-20°C) durante un mes. Transcurrido este tiempo, se descongelaron, se procesaron e inyectaron al sistema cromatográfico.

Criterio de aceptación: Para todas las pruebas, se considera que las muestras son estables a la condición analizada si el coeficiente de variación entre el promedio de concentración recuperada de las muestras de prueba y el promedio de concentración recuperada de las muestras de control frescas es menor al 15%

Capítulo 4: Resultados y discusión.

4.1 Selección de condiciones cromatográficas:

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos al emplear diferentes fases móviles y columnas cromatográficas candidatas para ser usadas en el análisis.

Se encontró que una fase móvil con un alto contenido de sales, como es el caso del acetato de sodio 0.1 M, ocasionaba líneas base ruidosas y mala definición de picos, por lo que se optó por el uso de agua y ácido acético, con lo cual se obtuvieron señales con mayor definición.

Los resultados obtenidos al utilizar las diferentes columnas cromatográficas se presentan en la tabla 5. Al utilizar la columna Hypersil ODS, se obtuvieron los tiempos de retención más cortos y señales más definidas, por lo que se consideró la adecuada para continuar con el desarrollo del método.


Tabla 5: Influencia de la fase móvil y tipo de columna en la respuesta cromatográfica de diclofenaco:

Fase Móvil	Columnas probadas	Descripción de la respuesta	Tiempo de Retención
ACN:MetOH: Acetato de sodio 0.1M (25:30:45) pH=7.9	LiChrosorb, LiChrospher	Picos extendidos y de poca definición; señales bajas.	6.2 min
ACN: Acetato de sodio 0.1 M (45:55) pH=7.7	LiChrosorb, LiChrospher	Señal suficiente, Pero no fue lineal en los dos últimos puntos de la curva	5.8 min
MetOH: Acetato de sodio 0.1 M (45:55) pH= 7.4	LiChrospher	Señal suficiente; línea base muy ruidosa	7.5 min
ACN:H ₂ O:Ácido acético glacial (60:40:2) pH 2.8	LiChrospher,	Señal poco definida en tiempo de retención considerablemente aceptable	6.3 min
ACN:H ₂ O:Ácido acético glacial (60:40:2) pH 2.8	Hypersil ODS	Señal suficiente y definida en un tiempo de retención aceptable en columna ODS	4.1 min

Una vez seleccionada la fase móvil y la columna cromatográfica, se procedió a evaluar la linealidad del sistema en el rango de concentración de 0.15 a 3.0 µg/ml. Los

resultados que se presentan en la tabla 6, muestran que el método es lineal, en el intervalo de trabajo seleccionado.

Tabla 6: Linealidad del sistema para la cuantificación de diclofenaco sódico en fase móvil (Acetonitrilo:Agua:Ácido acético glacial 60:40:2 v:v:v)

Concentración adicionada (µg / ml)	Altura (mAbs)
3.0	17555
2.0	11894
1.0	6139
0.5	3254
0.3	1250
0.15	770
	
Ecuación de la recta	$y = 5921.6x - 48.969$
R ²	R ² = 0.9979
Error estándar	337.93

4.2 Selección de disolvente y condiciones de extracción:

Previo a la validación del método fue necesario desarrollar una técnica de extracción del fármaco del plasma, para lo cual se evaluaron diferentes técnicas de extracción líquido-líquido y precipitación de proteínas. Los resultados, que se presentan en la tabla 7 disolvente de extracción fue el acetato de etilo ya que con este disolvente no se presentaron señales que interfirieran con el tiempo de retención de diclofenaco.

Tabla 7: Evaluación de condiciones de extracción de diclofenaco en plasma

Metodología de extracción	Condiciones de extracción	Consideraciones
Precipitación de proteínas plasmáticas con acetonitrilo, agitación y centrifugación	Plasma:ACN (5ml:5ml), agitación en vórtex, centrifugación 10000rpm/10min	Mucha señal del plasma interfiere con la detección; al no inyectarse la muestra en fase móvil ácida, el tiempo de retención varía de manera no sistemática
Extracción orgánica en éter etílico, con plasma acidificado. Reconstitución en fase móvil	Plasma:Ácido Fosfórico 2.5 M: éter etílico (300:150:600 µl); Mezclar en tubo Eppendorf y agitar en vórtex a velocidad 7 por 1min. Centrifugar a 10000rpm/10min; evaporar y reconstituir en igual volumen de fase móvil que plasma usado	El método en pequeño ocasiona incertidumbre en tanto que las pérdidas que se pudieran tener durante la manipulación generen alta variabilidad. La extracción en éter arrastra muchos compuestos del plasma, que se traducen en picos que interfieren con la cuantificación de diclofenaco.
Extracción orgánica en acetato de etilo, con plasma acidificado. Reconstitución en fase móvil	Plasma:Ácido Fosfórico 2.5 M: acetato de etilo (1:0.6:3 v.v.v); agitación horizontal a 130 mov/min por 15min, centrifugación 5000rpm/10min; evaporar y reconstituir en igual volumen de fase móvil que plasma usado	Señal definida, tiempo de retención congruente con el del sistema cromatográfico; no hay señales que puedan adjudicarse al plasma en tiempos de retención mayores a 3 minutos.

Tomando en cuenta que se presentó variabilidad en la respuesta, se procedió a optimizar la técnica. De los cambios que se realizaron a la técnica, se encontró que la variabilidad se redujo, lo cual se logró al aumentar el volumen de fase orgánica a 3.5 ml, reconstituir en un volumen de fase móvil de 0.4 ml, reducir la velocidad de centrifugación a 3000 RPM y emplear agitación vertical en vórtex por 1 min.

4.3 Identificación de Estándar Interno:

El uso de un estándar interno permite reducir el efecto que la matriz biológica en la cuantificación del analito. El uso de estándar interno permite reducir variabilidad en los análisis, ya que idealmente toda modificación que sufra el analito la sufrirá el estándar interno, de manera que al calcular un cociente de respuesta del analito sobre el estándar interno, se obtendrá una respuesta más constante que la respuesta cromatográfica directa del analito.

Los estándares internos probados presentan una composición química similar al diclofenaco sódico; terapéuticamente se clasifican también como AINEs. Para efectos de las pruebas, éstos se utilizaron en soluciones de una concentración de 5 µg/ml.

En la tabla 8 se observan los resultados obtenidos con los compuestos probados como candidatos para ser utilizados como estándar interno. Se percibe que varios de ellos presentan tiempos de retención en la región de elución de componentes del plasma. En el caso de la indometacina, el tiempo de retención de 2.6 min presentó interferencias con el tiempo de retención del fármaco bajo estudio. El ibuprofeno resultó ser el compuesto más prometedor como estándar interno, sin embargo, la intensidad de la señal fue muy baja, como se aprecia en la tabla 9. Por lo anterior, no fue posible identificar un compuesto que pudiera ser empleado como estándar interno para este método analítico.

Tabla 8: Compuestos probados

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Observaciones
Ácido benzóico	2.0	N/A
Ketoprofeno	2.6	N/A
Ketorolaco	2.2	N/A
Indometacina	3.8	El pico se empalma con el de diclofenaco
Ibuprofeno	4.3	Completamente separado de pico de diclofenaco

Tabla 9: Pruebas de ibuprofeno como estándar interno

Prueba	Resultado
Adición de 100 µl de solución de 1.5 µg/ml de ibuprofeno	No hay suficiente señal de ibuprofeno
Adición de 200 µl de solución de 3.0 µg/ml de ibuprofeno	No se redisuelve en el volumen de fase móvil empleado.

4.4 Método analítico para cuantificación de diclofenaco en plasma

Una vez evaluadas las condiciones cromatográficas y de extracción, el método desarrollado es el siguiente:

El sistema cromatográfico se compone de una columna Hypersil ODS (150x4.6 mm), y una fase móvil de Acetonitrilo:Agua:Ácido acético glacial (60:40:2, V:V:V). El flujo de ésta es de 1.0 ml/min. El sistema de detección es espectrofotométrico a una longitud de onda de 278 nm (región ultravioleta).

Para la extracción del fármaco del plasma, se emplea 1.0 ml de plasma, al cual se le adicionan 0.6 ml de ácido fosfórico 2.5 M y 3.5 ml de acetato de etilo. Se agita en un vórtex durante 1 minuto, para posteriormente centrifugar a 3000 RPM por 10 minutos. El sobrenadante obtenido es retirado y llevado a evaporación en un baño de temperatura a 60°C; el sedimento se reconstituye con 0.4 ml de fase móvil, y se inyecta un volumen de 50µl al sistema cromatográfico.

El método desarrollado tiene las siguientes características:

Tabla 10: Características del método analítico para cuantificación de diclofenaco sódico en plasma

Fase móvil	Acetonitrilo:Agua:Ácido acético glacial (60:40:2, V:V:V),
Flujo	1.0 ml/min
Volumen de Inyección	50µl
Columna	Hypersil ODS 150x4.6 mm
Tiempo de retención	4.2 min
Longitud de onda	278 nm
Sistema de extracción líquido-líquido	Plasma: ácido fosfórico 2.5M : acetato de etilo (1:0.6:3.5 ml)
Agitación	Vortex, velocidad 7, 1 minuto
Centrifugación	3000 RPM, 10 minutos
Volumen de reconstitución	400µl

4.5 Prueba de linealidad del método:

La tabla 11 muestra los resultados para tres curvas de calibración preparadas independientemente. En ella se puede observar que los valores son semejantes en cada una de las concentraciones utilizadas.

Tabla 11: Resultados de tres curvas de calibración

Concentración (µg/ml)	Altura (mAbs)			PROMEDIO	SD	CV%
	A	B	C			
3	48538	49782	49553	49291	662.0929	1.34
2	36097	34529	34974	35200	808.0613	2.29
1	13962	13835	14220	14005.67	196.1793	1.40
0.5	7093	7535	7543	7390.33	257.5293	3.48
0.3	3605	3312	3209	3375.33	205.4564	6.09
0.15	1128	1231	1323	1227.33	97.5517	7.95

Tabla 12: Ecuaciones de Altura vs Concentración

Curva	A	B	C
Ecuación Altura vs Concentración	$y = 17215x - 1536.5$ $R^2 = 0.9903$	$y = 17349x - 1725.3$ $R^2 = 0.9927$	$y = 17330x - 1604$ $R^2 = 0.9952$
Ecuación log Altura vs Log Conc.	$y = 1.2393x + 4.1544$ $R^2 = 0.9917$	$y = 1.2245x + 4.1548$ $R^2 = 0.9966$	$y = 1.165x + 4.1665$ $R^2 = 0.9963$

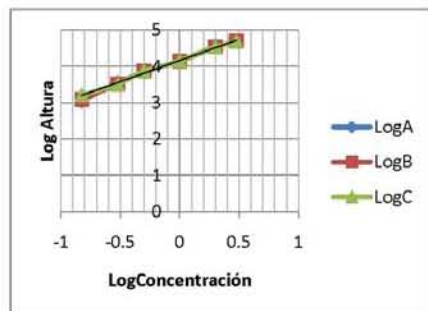


Figura 2: Linealidad de las curvas de calibración, con valores convertidos a escala logarítmica.

Al compararse los valores de coeficiente de determinación de las ecuaciones generadas, se encuentra que el modelo que ajusta de mejor manera los datos a una ecuación lineal es un modelo logaritmo de altura vs logaritmo de concentración. La

explicación que puede encontrarse para el hecho de que el modelo logarítmico ajuste mejor los datos es que al no emplearse un estándar interno, el orden de magnitud de las alturas es de 10^4 . Sin embargo, al aplicarse la conversión a valores logarítmicos, se reduce el orden de magnitud, y con esto el impacto de las cifras significativas al trazo gráfico.

Por lo anterior, se emplea un modelo LogAltura vs LogConcentración para éste método analítico.

4.6 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DICLOFENACO EN PLASMA

4.6.1 SELECTIVIDAD

La figura 3 muestra el tiempo de retención y el pico característico del diclofenaco en este método cromatográfico.

La figura 4 muestra el blanco de reactivos, la fase móvil. Se observa que no hay ninguna señal que pudiera interferir en la lectura.

La figura 5 muestra el pico de diclofenaco sódico en plasma; se observa una región de señales altas y ruidosas al inicio de la corrida; sin embargo, esta señal se atenúa aproximadamente un minuto antes del pico de diclofenaco, de manera que no interfiere en la respuesta. La figura 6 efectivamente muestra que en el tiempo de retención cercano al de diclofenaco, no se encuentran señales que pudieran interferir con la cuantificación de diclofenaco.

Las figuras 7y 8 muestran picos de otros compuestos antiinflamatorios no esteroideos. Como se puede observar, los tiempos de retención para estos son muy menores que el de diclofenaco, por lo que no se consideraría que estos pudieran interferir con la respuesta en caso de ser administrados concomitantemente.

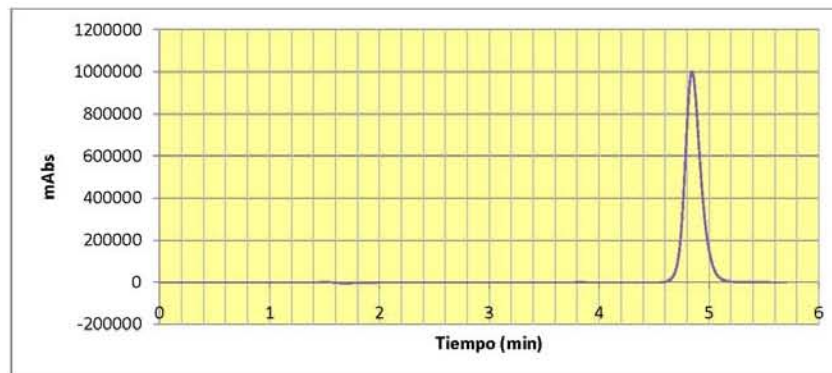


Figura 3: Diclofenaco sódico en solución.



Figura 4 : Blanco de reactivos

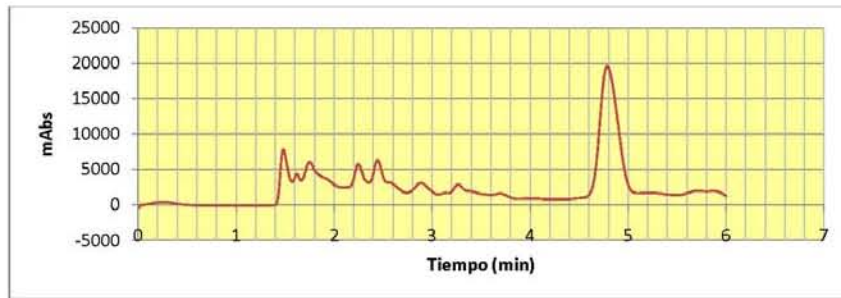


Figura 5: Plasma con diclofenaco sódico

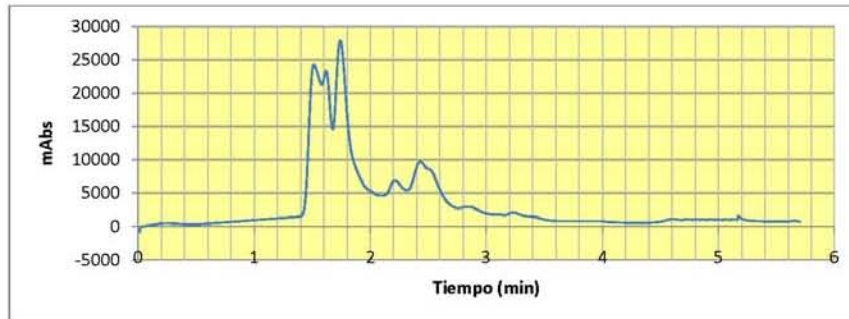


Figura 6: Pool de voluntarios, blanco.

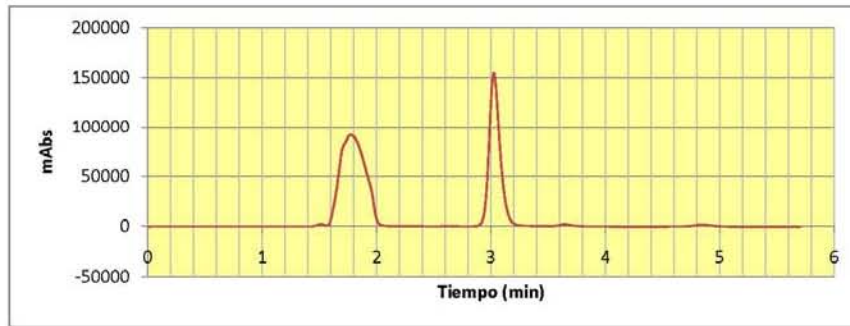


Figura 7: Ketoprofeno (primer pico) y paracetamol (segundo pico) en solución

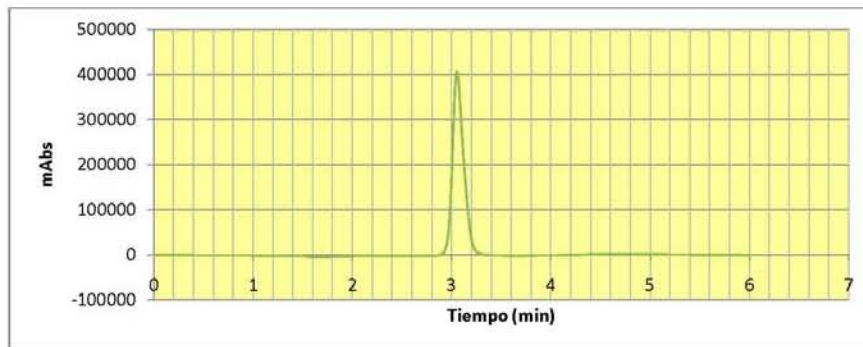


Figura 8: Naproxeno en solución

4.6.2 LINEALIDAD

En la tabla 13 se muestran los resultados de respuesta vs concentración obtenidos de las tres curvas de calibración y en la figura 9 se encuentra representada la curva de calibración. El modelo al que mejor se ajustaron los datos fue el modelo log de concentración vs log de la altura.

Se observa que no existen diferencias grandes en los valores de las pendientes para ninguna de las curvas ni en los interceptos, al analizar las muestras en un mismo día.

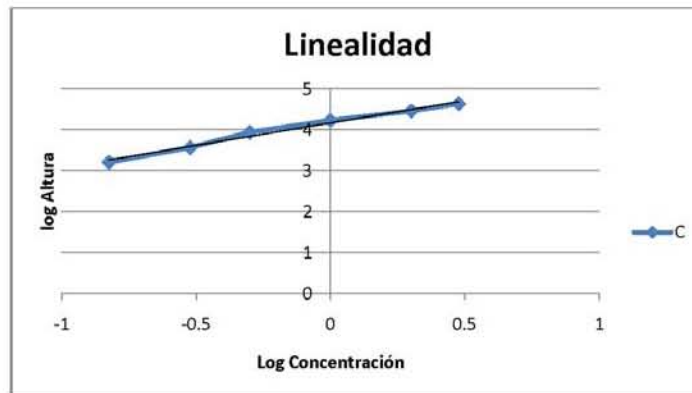


Figura 9: Linealidad del método analítico para la cuantificación de diclofenaco en el rango de concentración de 0.15 a 3.0 $\mu\text{g/ml}$

Tabla 13: Relación entre logaritmo de concentración y logaritmo de altura para la cuantificación de diclofenaco en plasma

16-08-2010		Log Altura (LogmAbs)		
LogConcentración	Curva A	Curva B	Curva C	
	A	B	C	
0.477121	4.63787982	4.60931688	4.63713935	
0.30103	4.46971895	4.49854487	4.51503888	
0	4.20390278	4.19027566	4.17914948	
-0.30103	3.92220628	3.99947853	3.96421247	
-0.52288	3.69844854	3.60809795	3.6349808	
Ecuación de la Recta				
	$\log H = 1.0321(\log C) + 4.1784$	$\log H = 1.0428(\log C) + 4.1854$	$\log H = 1.0119(\log C) + 4.1823$	
R²	0.9806	0.9899	0.9921	
Error Estándar	0.0807	0.0584	0.0500	
Error relativo debido a la regresión	1.28	1.61	1.49	
25-08-2010		Log Altura (LogmAbs)		
LogConcentración	Curva A	Curva B	Curva C	
	A	B	C	
0.477121	4.613355	4.642336	4.642662	
0.30103	4.502359	4.540755	4.463774	
0	4.245068	4.178891	4.232793	
-0.30103	3.958134	3.976992	3.97359	
-0.52288	3.563244	3.528274	3.567967	
Ecuación de la Recta				
	$\log H = 1.0562(\log C) + 4.1794$	$\log H = 1.0805(\log C) + 4.1819$	$\log H = 1.0884(\log C) + 4.1729$	
R²	0.9830	0.9819	0.9802	
Error Estándar	0.0771	0.0815	0.0860	
Error relativo debido a la regresión	1.97	1.77	1.62	

4.6.3 PRECISIÓN:

4.6.3.1 REPETIBILIDAD

Los resultados de precisión se encuentran resumidos en la tabla 14. En ella se pueden observar los valores obtenidos para el coeficiente de variación no excedieron el valor del 15% lo cual permite inferir la repetibilidad del método.

Tabla 14: Promedios de concentración recuperada para cada rango de concentración, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Concentración adicionada ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Concentración Recuperada promedio ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	SD	CV%
2.5	2.35	0.1235	5.26
1.5	1.48	0.0651	4.40
0.45	0.46	0.0282	6.18

4.6.3.2 PRECISIÓN: REPRODUCIBILIDAD INTERDÍA:

En la tabla 15 se presentan los resultados de concentración recuperada para cada día de análisis, mientras que en la tabla 16 se presentan las medidas de tendencia central y dispersión. En esta última tabla se puede observar que el coeficiente de variación global (para los tres días) fue menor en todos los rangos de concentración al 15%, por lo que el método es reproducible.

Tabla 15: Precisión del método analítico para cuantificar diclofenaco en plasma en diferentes días.

Concentración (µg/ml)	Día 1		Día 2		Día 3	
	Concentración Recuperada (µg / ml)	Concentración (µg/ml)	Concentración Recuperada (µg / ml)	Concentración (µg/ml)	Concentración Recuperada (µg / ml)	Concentración (µg/ml)
2.5	2.37	2.5	2.29	2.5	2.47	2.5
2.5	2.23	2.5	2.15	2.5	2.55	2.5
1.5	1.44	1.5	1.32	1.5	1.45	1.5
1.5	1.46	1.5	1.37	1.5	1.47	1.5
0.45	0.46	0.45	0.43	0.45	0.42	0.45
0.45	0.46	0.45	0.44	0.45	0.4	0.45

Tabla 16: Concentraciones recuperadas promedio para cada rango de concentración, desviación estándar y coeficiente de variación.

Concentración adicionada (µg / ml)	Concentración Recuperada promedio (µg / ml)	SD	%CV
2.5	2.34	0.1498	6.39
1.5	1.42	0.0606	4.27
0.45	0.43	0.0233	5.37

4.6.4 EXACTITUD:

La tabla 17 muestra las desviaciones estándar absolutas calculadas para cada muestra obtenida en los ensayos de precisión.

Dado que ningún punto individual supera el valor límite de DEA de 15%, el método se considera exacto.

Tabla 17: Desviaciones estándar absolutas de cada muestra inyectada para los cálculos de precisión.

Concentración adicionada (µg / ml)	Concentración recuperada (µg / ml)	DEA
2.5	2.37	5.07
2.5	2.23	10.75
2.5	2.29	8.40
2.5	2.15	14.04
2.5	2.47	1.03
2.5	2.55	1.82
1.5	1.44	3.67
1.5	1.46	2.416
1.5	1.32	12.15
1.5	1.37	8.47
1.5	1.45	3.14
1.5	1.47	2.32
0.45	0.46	1.59
0.45	0.46	1.99
0.45	0.43	4.52
0.45	0.44	1.62
0.45	0.42	7.34
0.45	0.40	11.16

4.6.5 RECUPERACIÓN ABSOLUTA:

La tabla 18 muestra las alturas de las muestras plasmáticas y en solución inyectadas para cada rango de concentración. Se observa que las alturas de las muestras en solución son menores a las alturas de las muestras plasmáticas, pero recordar que las muestras plasmáticas se encuentran 2.5 veces mas concentradas.

La tabla 18 muestra también el porcentaje de recuperación para los tres niveles de concentración, calculado realizando el ajuste apropiado a las alturas de las soluciones. Se observa que para todos los rangos de concentración, se obtiene un recobro mayor al 90%

Tabla 18: Resultados de recobro absoluto

CONCENTRACIÓN NOMINAL (µg/mL)	ALTURAS EN PLASMA	ALTURAS EN SOLUCIÓN	RECOBRO%
MUESTRAS CONTROL BAJO			
0.45	6723	2533	97.83
0.45	6118	2721	
0.45	6603	2696	
PROMEDIO	6481.33	2650	
CV %	4.94	3.85	
MUESTRAS CONTROL MEDIO			
1.5	24124	8419	97.62
1.5	22928	10211	
1.5	22048	9412	
PROMEDIO	23033.33	9347.33	
CV %	4.52	9.61	
MUESTRAS CONTROL ALTO			
2.5	31795	12804	101.99
2.5	30530	12345	
2.5	33750	12528	
PROMEDIO	32025	12559	
CV %	2.87	2.59	
RECOBRO ABSOLUTO PROMEDIO			99.15
CV %			2.49

4.6.6 LÍMITE INFERIOR DE CUANTIFICACIÓN:

Los resultados muestran que el último punto de la curva de calibración (0.15 µg/ml) se encuentra dentro de los límites establecidos para concentración recuperada y es repetible (como se observa en la tabla 19), mientras que puntos inferiores (como el punto probado, 0.075 µg/ml) no lo hacen (ejemplificado en la tabla 20), lo cual demuestra que la concentración mínima cuantificable es de 0.15 µg/ml

Tabla 19: Concentraciones recuperadas para muestras de 0.15 µg / ml y medidas de dispersión.

Concentración (µg / ml)	Altura (mAbs)	Concentración recuperada (µg / ml)	Promedio	0.13
0.15	1787	0.12	SD	0.0067
0.15	2002	0.14	CV%	5.16
0.15	1811	0.12		
0.15	1834	0.13		
0.15	1975	0.14		

Tabla 20: Concentraciones recuperadas para muestras de 0.075 µg / ml y medidas de dispersión.

Concentración (µg / ml)	Altura (mAbs)	Concentración recuperada (µg / ml)	Promedio	0.060
0.075	1001	0.069	SD	0.01453
0.075	590	0.041	CV%	24.199
0.075	1041	0.072		
0.075	1009	0.069		
0.075	676	0.047		

4.6.7 INFLUENCIA DE LA DILUCIÓN:

Al comparar los resultados de de las muestras diluidas (1:2) con aquellos obtenidos al analizar la concentración más alta, se encontró que la desviación absoluta no fue mayor que el 15% con respecto a las muestras sin diluir, lo que indica que la dilución no influye en la respuesta cromatográfica de diclofenaco

Tabla 21: Efecto de la dilución

Concentración adicionada ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Dilución	Concentración de muestra diluida ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Altura (mAbs)	Concentración recuperada ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Conc. Recuperada recalculada ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	DEA
5	1/2	2.5	33108	2.17	4.33	13.33
5	1/2	2.5	36093	2.36	4.72	5.62

Promedio	2.26
SD	0.1363
CV%	6.02

4.6.8 ESTABILIDAD

Tanto a nivel nacional como internacional, la normatividad señala que es necesario documentar la estabilidad de fármacos en la matriz biológica tanto a largo como a corto plazo. Los resultados de las pruebas realizadas se presentan en las tablas 22 a

Todas las muestras de estabilidades fueron analizadas junto con tres muestras de cada punto control preparadas justo antes del análisis, denominadas muestras frescas. Las tablas presentan el promedio de estas muestras para cada rango de concentración.

4.6.8.1 ESTABILIDAD: MUESTRA PROCESADA EN AUTOINYECTOR (3 HORAS)

La tabla 22 muestra que el coeficiente de variación entre las muestras procesadas guardadas en el autoinyector por tres horas y las muestras control no es mayor al valor establecido, lo que demuestra estabilidad de la muestra procesada bajo estas condiciones.

Tabla 22: Resultados de análisis de muestras procesadas en automuestreador

muestras procesadas almacenadas			muestras frescas		
Concentración adicionada ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Altura (mAbs)	Concentración recuperada ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Concentración adicionada ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Altura (mAbs)	Concentración recuperada ($\mu\text{g} / \text{ml}$)
2.5	32878	2.12	2.5	34853	2.279567
2.5	35280	2.27	2.5	33273	2.177532
2.5	36920	2.37	2.5	33085	2.165387
1.5	21936	1.43	1.5	21954	1.444513
1.5	20619	1.34	1.5	22964	1.510089
1.5	21971	1.43	1.5	22396	1.473215
0.45	5728	0.38	0.45	5950	0.398159
0.45	6019	0.4	0.45	6545	0.437435
0.45	5993	0.4	0.45	5931	0.396904
Rango de concentración ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Concentración recuperada promedio de muestra procesada ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Concentración recuperada promedio de muestra fresca ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Promedio	SD	%CV
2.5	2.26	2.21	2.23	0.0343	1.53
1.5	1.46	1.48	1.47	0.0125	0.85
0.45	0.42	0.41	0.41	0.003	0.74

4.6.8.2 ESTABILIDAD: MUESTRA PROCESADA CONGELADA (24H)

La tabla 23 muestra que el coeficiente de variación entre las muestras procesadas almacenadas en congelación (-20°) y las muestras control no es mayor al valor establecido, lo que demuestra estabilidad de la muestra procesada en congelación.

Tabla 23: Resultados del análisis de muestras procesadas congeladas (24h).

Muestras almacenadas			Muestras frescas		
Concentración adicionada (µg / ml)	Altura (mAbs)	Concentración recuperada (µg / ml)		Rango de concentración (µg / ml)	Promedio
2.5	34853	2.28		2.5	2.16
2.5	34273	2.24		1.5	1.45
2.5	34085	2.23		0.45	0.38
1.5	21954	1.44			
1.5	22044	1.45			
1.5	22288	1.47			
0.45	5950	0.4			
0.45	5545	0.37			
0.45	5728	0.38			
Rango de concentración (µg / ml)	Concentración recuperada promedio de muestra procesada (µg / ml)	Concentración recuperada promedio de muestra fresca (µg / ml)	Promedio	SD	%CV
2.5	2.2	2.16	2.18	0.0229	1.05
1.5	1.46	1.45	1.46	0.0033	0.22
0.45	0.41	0.38	0.4	0.0176	4.44

4.6.8.3 ESTABILIDAD: MUESTRA EN MESA DE TRABAJO (24H)

La tabla 24 muestra que el coeficiente de variación entre las muestras almacenadas y las muestras control no es mayor al valor establecido, lo que demuestra estabilidad de la muestra procesada en la mesa de trabajo por 24h.

Tabla 24: Resultados del análisis de muestras en mesa de trabajo.

Muestras almacenadas			Muestras frescas		
Concentración adicionada ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Altura (mAbs)	Concentración recuperada ($\mu\text{g} / \text{ml}$)		Rango de concentración ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Promedio
2.5	35619	2.33		2.5	2.16
2.5	34969	2.29		1.5	1.45
1.5	19937	1.31		0.45	0.38
1.5	19867	1.31			
0.45	6507	0.43			
0.45	5837	0.39			
Rango de concentración ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Concentración recuperada promedio de muestra procesada ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Concentración recuperada promedio de muestra fresca ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Promedio	SD	%CV
2.5	2.31	2.16	2.24	0.1015	4.54
1.5	1.31	1.45	1.38	0.1008	7.29
0.45	0.41	0.38	0.40	0.0201	5.05

4.6.8.4 ESTABILIDAD: CICLOS DE CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN (24H):

La tabla 25 muestra que el coeficiente de variación entre las muestras sometidas a ciclos de congelación (-20°) y descongelación y las muestras control no es mayor al valor establecido, lo que demuestra estabilidad durante ciclos de congelación y descongelación.

Tabla 25: Resultados del análisis de muestras sometidas a 3 ciclos de congelación y descongelación.

Muestras almacenadas			Muestras frescas		
Concentración adicionada (µg / ml)	Altura (mAbs)	Concentración recuperada (µg / ml)		Rango de concentración (µg / ml)	Promedio
2.5	32826	2.15		2.5	2.16
2.5	34682	2.27		1.5	1.45
2.5	35954	2.35		0.45	0.38
1.5	22768	1.5			
1.5	21760	1.43			
1.5	21971	1.45			
0.45	6079	0.41			
0.45	6829	0.46			
0.45	5714	0.38			
Rango de concentración (µg / ml)	Concentración recuperada promedio de muestra procesada (µg / ml)	Concentración recuperada promedio de muestra fresca (µg / ml)	Promedio	SD	%CV
2.5	2.26	2.16	2.2101	0.0647	2.93
1.5	1.46	1.45	1.4559	0.0033	0.22
0.45	0.42	0.38	0.3997	0.0218	5.45

4.6.8.5 ESTABILIDAD: ALMACENAMIENTO EN CONGELACIÓN A LARGO PLAZO:

La tabla 26 muestra que el coeficiente de variación entre las muestras almacenadas en congelación (-20°) y las muestras control no es mayor al valor establecido, lo que demuestra estabilidad en congelación durante un mes.

Tabla 26: Resultados del análisis de muestras almacenadas un mes en congelación (-20°C)

Muestras almacenadas			Muestras frescas		
Concentración adicionada (µg / ml)	Altura (mAbs)	Concentración recuperada (µg / ml)		Rango de concentración (µg / ml)	Promedio
2.5	38548	2.52		2.5	2.16
2.5	33306	2.18		1.5	1.45
2.5	34595	2.26		0.45	0.38
1.5	20854	1.37			
1.5	19641	1.29			
1.5	19871	1.31			
0.45	5780	0.39			
0.45	6118	0.41			
0.45	6596	0.44			
Rango de concentración (µg / ml)	Concentración recuperada promedio de muestra procesada (µg / ml)	Concentración recuperada promedio de muestra fresca (µg / ml)	Promedio	SD	%CV
2.5	2.32	2.16	2.24	0.1101	4.91
1.5	1.33	1.45	1.39	0.0906	6.52
0.45	0.41	0.38	0.4	0.0197	4.96

Capítulo 5: Conclusiones

Conclusiones:

Se desarrolló un método analítico sencillo, preciso y exacto para cuantificar diclofenaco sódico en plasma humano por cromatografía líquida de alta resolución.

El método demostró ser:

Lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones de 0.15 a 3.0 µg/ml.

La sensibilidad del método, con un límite inferior de cuantificación de 0.15 µg/ml, es suficiente para las aplicaciones biofarmacéuticas para las que se desarrolló el método. Selectivo, no se presentaron interferencias de sustancias endógenas del plasma, ni de la presencia de fármacos antiinflamatorios (naproxeno, ketoprofeno, paracetamol) que pueden ser administrados concomitantemente.

El porcentaje de recobro es constante y de aproximadamente 95%.

Preciso y exacto cuando se efectúa una dilución de la muestra con plasma libre de fármaco a razón de 1:2.

La muestra analítica se mantiene estable por lo menos hasta 24 horas a temperatura ambiente, hasta 3 ciclos de congelación / descongelación, por lo menos hasta 3 horas en automuestreador, y tiene una estabilidad bajo condiciones de almacenamiento -20°C de al menos 30 días.

El método analítico desarrollado permite la cuantificación de diclofenaco sódico en plasma, de manera que puede ser usado para estudios de farmacocinética y bioequivalencia.

Bibliografía:

- 1 Sallmann, A. *The history of diclofenac* en *The American Journal of Medicine*. Vol 80, Número 4, Suplemento 2, 1986. Pp 29-33
- 2 <http://www.healthystock.net/drugs/diclofenac.shtml>
- 3 Rang, H. & Dale, M. *Farmacología*.- 5ª Edición.- España. Elsevier, 2003.
- 4 *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas PLM*.- 54ª Edición.- México. Thompson PLM, 2008.
- 5 *Acuerdo por el que se relacionan las especialidades farmacéuticas susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables y se determinarán las pruebas que deberán aplicarse* publicado en el Diario Oficial de la Federación con fecha de 11 de febrero de 2005.
- 6 NOM-177-SSA1-1998, *Que Establece Las Pruebas y procedimientos para demostrar que un Medicamento es Intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas*
- 7 Chuasuwan, B. Binjesoh, V. Polli, J. et al. *Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Diclofenac Sodium and Diclofenac Potassium*. Publicado en línea en Wiley Interscience, 27 de agosto de 2008.
- 8 Katzung, G. *Basic & Clinical Pharmacology*.- 9ª Edición. E.U.A. Lange Medical Books, 2004
- 9 Hasan, F. Ahmed, T. Talib, N. et al. *Pharmacokinetics of diclofenac sodium in normal man* en *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol.18 Número 1, 2005. Pp. 18-24
- 10 Nawaz, R., Ullah, Z., Asma, B. et al. *Kinetics of diclofenac sodium; single oral dose disposition in male volunteers* en *The Professional.*, Vol. 14 Número 4, 2004. Pp. 411-416
- 11 Lötsch, J. Kettenmann, B. Renner, B. et al. *Population pharmacokinetics of fast release oral diclofenac in healthy volunteers: Relation to pharmacodynamics in an experimental pain model* en *Pharmaceutical Research*. Vol. 17, Número 1, 2000. Pp. 77-84
- 12 Idkaidek, N. Amidon, G. Smith, D. et al. *Determination of the Population Pharmacokinetic Parameters of Sustained-Release and Enteric-Coated Oral Formulations, and the Suppository Formulation of Diclofenac Sodium by Simultaneous Data Fitting Using NONMEM* en *biopharmaceutics & drug disposition*. Vol. 19, 1998. Pp. 169-174

- 13 Kirchheiner, J. Meineke, I. Steinbach, N. et al. *Pharmacokinetics of diclofenac and inhibition of cyclooxygenase 1 and 2: no relationship to the CYP2C9 genetic polymorphism in humans* en *British Journal of Clinical Pharmacology*. Vol. 55, 2003. Pp. 51-61
- 14 Amador, N. *Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar carvediol en plasma y su aplicación en un estudio de biodisponibilidad*.- Tesis.- México. Facultad de Química, 2009
- 15 Harris, D. *Análisis Químico Cuantitativo*.- 2ª Edición.- España. Editorial Reverté, 2001.
- 16 Skoog, D. et al. *Análisis Instrumental*.- 2ª Edición.- México, McGraw-Hill, 1989.
- 17 Kazakevich, Y. *HPLC for pharmaceutical scientists*.- E.U.A. John Wiley & Sons, Inc, 2007.
- 18 Troy, D. *Remington: The science and practice of pharmacy*.- 21ª Edición.- E.U.A. Lippincott, Williams & Wilkins, 2006.
- 19 *Normas Internacionales ISO 9000- 2000 para el Desarrollo de los Sistemas de Gestión de la Calidad*
- 20 *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. Food and Drug Administration, 2001.
- 21 Mayer, B. Namiranian, K, Deghanyar, P. et al, *Comparison of UV and tandem mass spectrometric detection for the high-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in microdialysis samples* en *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 33, 2003. Pp 745-754
- 22 Panusa, A. Multari, G. Incarnato, G. et al, *High-performance liquid chromatography analysis of anti-inflammatory pharmaceuticals with ultraviolet and electrospray-mass spectrometry detection in suspected counterfeit homeopathic medicinal products* en *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 43,2007. Pp 1221–1227
- 23 García, C. Rodríguez, D. Cortezón, A. et al, *Determinación de diclofenaco de sodio por cromatografía líquida de alta resolución en un colirio al 0,1 %* en *Revista Cubana de Farmacia*. Número 43, 2009.
- 24 Hajkova, R. Solich, P. Pospisilova, M. et al, *Simultaneous determination of methylparaben, propylparaben, sodium diclofenac and its degradation product in a topical emulgel by reversed-phase liquid chromatography* en *Analytica Chimica Acta*. Vol. 467, 2002. Pp 91–96
- 25 Sultan, M., Stecher, G. Stöggli, W. et al, *Sample Pretreatment and Determination of Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Pharmaceutical Formulations and*

Biological Samples (Blood, Plasma, Erythrocytes) by HPLC-UV-MS and μ -HPLC en *Current Medicinal Chemistry*. Vol. 12, 2005. Pp. 573-588

26 Sun, Y. Takaba, K. Kido, H. *et al*, *Simultaneous determination of arylpropionic acidic nonsteroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulations and human plasma by HPLC with UV detection* en *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 30, 2003. Pp. 1611-1619

27 Zorica, P. Milena, P. Milanka, J., *pharmacokinetics of diclofenac in pigs after intramuscular administration of a single dose* en *Acta Veterinaria (Beograd)*, Vol. 56, Número 4, 2006. Pp 323-331

28 Arcelloni, C. Lanzi, R. Pedercini, S. *High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma after solid-phase extraction.* en *Journal of Chromatography B*. Número 763, 2001. Pp 195-200

29 Scheeweis, A. Muller-Goymann, C. *In vivo and in vitro diclofenac sodium evaluation after rectal application of soft gelatine capsules enabling application induced transformation (AIT) into a semisolid system of liquid crystals (SLCC) for controlled release* en *Pharmaceutical Research*. Vol. 14, Número 12, 1997. Pp. 1726-1729

30 Hinz, B. *et al*, *Bioavailability of diclofenac potassium at low doses* en *British Journal of Clinical Pharmacology*. Vol. 59 Número 1, 2005. Pp. 80-84